АКАДЕМИЯ НАУК СОЮЗА ССР

МИКРОБИОЛОГИЯ

ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ, СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ
И ПРОМЫШЛЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ

ТОМ XVII. ВЫП. 2

МАРТ—АПРЕЛЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АКАДЕМИИ НАУК СССР
МОСКВА

1948

МИКРОБИОЛОГИЯ

Редактор академик Б. Л. Исаченко

Зам. редактора чл.-корр. Академии Наук СССР
А. А. Имшенецкий

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

А. Ф. Войткевич, Я. И. Раутенштейн, В. Л. Рыжков,
Ф. М. Чистяков, В. Н. Шапошников

ПО ВСЕМ ВОПРОСАМ ПОДПИСКИ НА ЖУРНАЛ „МИКРОБИОЛОГИЯ" ОБРАЩАТЬСЯ ПО АДРЕСУ: МОСКВА, Б. ЧЕРКАССКИЙ ПЕР., 2, КОНТОРА „АКАДЕМКНИГА".

Рукописи направлять по адресу:
Москва, Волхонка, 14, Издательство Академии Наук СССР,
редакции журнала «Микробиология»

О КЛАССИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ

Н. А. Красильников

Классификация живых существ является одним из наиболее трудных разделов биологической науки.

В ней, как в фокусе, концентрируются все наши познания об организмах. Чем глубже и полнее наши сведения об организмах, тем точнее они классифицируются. С прогрессом биологической науки совершенствуется и классификация живых существ.

Систематика низших организмов, особенно бактерий, совершенствуется крайне слабо. Объясняется это в значительной степени бедностью морфологических и цитологических признаков у микробов, а также отсутствием глубокого и всестороннего изучения этих существ.

В классификации организмов существуют два направления. Первое — это каталогизация форм, производимая на основе одного какого-либо или нескольких признаков, часто случайных, не связанных между собой. Второе — это построение системы на основе филогенетических данных, полученных путем комплексного и всестороннего изучения организмов.

В микробиологии до сих пор систематика организмов строится по первому принципу.

Классификация первых систематиков-микробиологов (Müller [40], Ehrenberg [34], Perty [45], Cohn [31], Zopf [51], De Bary [33], Migula [39] и др.) строилась, как известно, на морфологических признаках в соответствии с общеботаническими воззрениями того времени.

Впоследствии, по мере изучения биологии микробов, начали применять многие другие признаки — физиологические, цитологические, серологические, иммунологические и др. В современных классификациях микробов авторы используют любой признак, лишь бы он выделялся и давал возможность отличить и распознать изучаемый организм. Любое отклонение используется в систематике для установления нового вида. Вследствие этого создается необычайное множество видов, в котором невозможно разобраться даже достаточно опытному специалисту.

Специализация биохимической деятельности микроорганизмов побуждает некоторых исследователей подразделять их на отдельные физиологические группы. Наиболее ярко выражена такая группировка в классификации Орла-Иенсена (Красильников [11]).

Бактерий подразделяют на основе способности их вызывать заболевания у человека, животных и растений. Создаются особые группы патогенных и фитопатогенных форм только по одному этому признаку.

Во всех этих классификациях нет единого общеботанического признака, и в этом отношении они стоят ниже уровня классификаций первых систематиков. Все они имеют сугубо прикладной, чисто диагностический характер.

В определителе американского общества бактериологов, издаваемом под редакцией Берже, все эти недостатки отражены особенно ярко. В нем нет ни единого принципа в распределении материала, ни четкости разграничения видов. Как в зеркале, в нем отражается хаотичность современных классификаций микробов.

Не удивительно, что с каждым новым изданием в определителе меняется группировка организмов. Перебрасываются из одной таксономической группы в другую не только отдельные виды, но роды и даже более высокие систематические единицы.

В одной и той же таксономической группе организмы распределяются то по морфологическим признакам, то по физиологическим; в одну и ту же группу включаются грамположительные и грамотрицательные, подвижные и неподвижные бактерии.

Неубедительны обоснования для выделения фитопатогенных бактерий в отдельный род, ибо все их признаки, кроме патогенности для растений, совпадают с таковыми сапрофитов. Не зная происхождения таких бактерий, невозможно отличить их от сапрофитов, встречающихся в почве и других субстратах; экспериментально же даже заведомо патогенные формы далеко не всегда вызывают экспериментальное заболевание у растений. Представители рода Phytomonas не отличаются от представителей рода Pseudomonas, а представители из рода Erwinia не отличаются от бактерий с перитрихиальными жгутиками (род Bacteria). Выделение таких специализированных форм можно допустить только в определителях специального назначения в целях большего удобства практической диагностики. То же относится и к патогенным бактериям, вызывающим заболевания у человека и животных.

Если придерживаться точки зрения авторов упомянутого определителя, то тогда следовало бы пересмотреть и переделать по признаку патогенности классификации грибов, простейших и других организмов.

Необоснованы и неудачны вновь вводимые родовые обозначения бактерий — Gaffkya, Klebsiella, Veillonella и др., ибо в них не отражается специфика. Сопоставляя определение рода Micrococcus, с одной стороны, и рода Gaffkya — с другой, нельзя найти различий, если отбросить ничего не дающее определение — «факультативный аэроб» — для последнего рода. Не видно различий и в определениях рода Micrococcus и Staphylococcus. Не удается уловить четкие разграничения между определениями семейств Enterobacteriaceae и Bacteriaceae. Диагностика их почти полностью совпадает. Да и по существу представители этих групп не отличаются настолько резко, чтобы выделять их в особые семейства.

Нечетко и нехарактерно также определение семейства Parvobacteriaceae. Все представители его — неспороносные, грамотрицательные и неподвижные формы, но одни — патогенны для человека и животных (Brucella, Pasteurella, Malleomyces и др.), другие — сапрофиты или коменсалы, обитающие в теле животных. Подразделение это чисто практического характера, а не биологического.

Авторы определителя часто объединяют в одну группу совершенно различные формы бактерий. Например, в семейство Rhizobiaceae включены бесцветные формы, клубеньковые бактерии Rhizobium, окрашенные организмы — Chromobacterium, фитопатогенные — Phytomonas и род Alcaligenes. Из этих организмов первые с полярными жгутиками, а среди Chromobacterium имеются перетрихи, моно- и лофотрихи.

В семейство Bacteriaceae авторы включают также бактерии разной природы: грамположительные и грамотрицательные, бесцветные и пигментированные, подвижные и неподвижные и т. д.

Существенным недостатком определителя, затрудняющим пользование им, является нечеткое разграничение вида, его необычайное дробление. Виды составляются по малейшему, не существенному и обычно случайному отклонению.

После изложенного невольно возникает вопрос: возможна ли классификация бактерий не на принципах формалистических, не в целях

каталогизации и диагностики, а на принципе филогенетических взаимоотношений, на основе родства изучаемых организмов?

Можем ли мы строить филогенез бактерий подобно тому, как это осуществляется в классификации растительного мира? Известно, что за последние десятилетия в области филогенетической систематики растений достигнуты большие успехи. Строится она на основе комплексных исследований различных дисциплин биологической науки — морфологии, цитологии, генетики, биохимии, серологии, геоботаники, палеоботаники и др. (Комаров, [51], Розанова [24]).

Особенности строения, развития и вообще биологическая специфика микробов не позволяет при изучении их применять все те методы, которые с успехом используются в ботанике.

Простота строения бактерий, отсутствие ядра и других органоидов в них, а также отсутствие полового процесса исключают возможность использования цито-морфологического метода в той степени, как это имеет место в систематике растений. Исключается здесь исторический метод. Нам ничего не известно о далеком прошлом микроорганизмов, нет ни достоверных отпечатков, ни окаменелостей древних предков микробов. Имеющиеся указания на такие отпечатки мало убедительны и ничего не дают для разъяснения исторических процессов эволюционного развития этих организмов (Залесский [1], Ярмоленко [27], Вологдин [1]).

Бактерии и другие микробы широко распространены в природе, характерной особенностью их распространения является космополитизм. Имеющиеся данные о географическом распределении бактерий и географической специфике их (Мишустин [17]) пока не дают возможности использовать их как метод систематизации.

Не применим здесь и генетический метод из-за отсутствия полового воспроизводства. Мы не касаемся дрожжей, где этот метод начинает разрабатываться после интересных работ Winge [50], Кудрявцева и Косикова [14].

Возможный и желательный биохимический метод систематики, к сожалению, остается в микробиологии неразработанным. Имеются пока единичные работы в этом направлении. Некоторые из них (Bartholomew [28]) представляют значительный интерес, так как уже теперь дают обоснование для подразделений бактерий на грамположительные и грамотрицательные формы (см. ниже).

Невзирая на приведенные отрицательные моменты, мы все же не можем согласиться с точкой зрения, что бактерии вообще не могут распределяться в естественные порядки.

В последние годы уже намечаются пути к построению такой систематики отдельных групп микроорганизмов. Автор этих строк в 1938 г. на основании экспериментального материала наметил схему филогении лучистых грибков.

Имшенецкий [4] излагает свои данные о родстве миксобактерий с установленной им группой промиксобактерий.

Материалы о филогенетических взаимоотношениях бактерий отмечаются в работах Шапошникова [26], Пешкова [22], а о филогении дрожжей — в работах Кудрявцева [12, 13] и других.

Stanier и van Niel [49], подвергая критическому обзору классификацию бактерий Берже, отмечают также необходимость и возможность в настоящее время строить систему бактерий по принципу филогенеза. В своей работе они разбирают фактический материал о бактериях с точки зрения их родства и рисуют схему их эволюции.

---

[1] Доклад на Конференции Института микробиологии АН СССР в 1946 г.

Подобные работы и построения схем филогенеза организмов, несмотря на умозрительность их, побуждают исследователей относиться к накопленному экспериментальному материалу по-новому и систематизировать его с определенных позиций, а не по случайным признакам.

Необходимо отметить, что если при изучении бактерий нельзя применять указанные выше методы классификации их, то здесь примечимы другие, не менее существенные, а иногда и более тонкие.

Как отмечает Курсанов [15], большим преимуществом здесь является возможность культивировать организмы и изучать каждый вид изолированно на питательных средах в лабораторных условиях.

Быстрое развитие и размножение микробов на средах дает возможность производить эксперименты и получать результаты в короткий срок. Особенно это важно в случаях массового анализа на большом числе поколений. Десятки и сотни тысяч поколений можно проследить в течение 1—2 суток роста бактерий или дрожжей, тогда как для высших растений потребовались бы многие годы.

Как бы ни были скудны морфологические признаки у бактерий, все же в своей совокупности и при сравнительном анализе они с успехом используются в подразделении основных таксономических единиц. В отдельных случаях и цитологические данные могут служить основанием для установления родства микробов. Например, наличие центрального тела у нитчатых бактерий Pontothrix и Oscillospira сближает их с синезелеными водорослями (Надсон и Красильников [7, 20]).

Следует подчеркнуть, что один и тот же внешний морфологический признак у микробов может иметь разное значение. Характерный для микобактерий признак ветвления клеток вовсе не характерен для бактерий, например, клубеньковых, уксуснокислых, азотобактера и др. У последних ветвление клеток — патологический процесс, наблюдаемый при дегенеративном перерождении; ветвящиеся клетки у этих бактерий представляют инволюционные, отмирающие формы. У микобактерий ветвление — нормальный формообразовательный процесс. Здесь ветки образуются у вполне жизнеспособных, растущих молодых клеток и представляют остатки ветвления мицелия у актиномицетов.

Значительную ценность дает метод наблюдения за развитием отдельных клеток и популяций (культур). Изучая организмы в последовательных фазах их развития, мы не только обогащаем морфологию данного организма, но одновременно путем сравнительного анализа глубже и полнее познаем вид с его разновидностями, расами и штаммами.

Серологический метод довольно широко применяется в бактериологии, главным образом в медицинской, для диагностики изучаемых организмов. Этим методом удается установить родство отдельных видов и, наоборот, улавливать тонкие различия в составе близко родственных популяций. Серологически, например, доказывается родство Phytomonas tumefaciens, Radiobacter и Rhisobium (Coleman и Reid [32]); B. aerogenes и B. friedlanderi (Osterman и Rettger [44] и др.).

Однако этот метод не всегда дает четкие и определенные показатели. Даже в одной и той же группе среди близких между собой организмов, например среди клубеньковых бактерий, не всегда удается выявить родственную связь между ними (Израильский [2]). Вследствие этого данный метод, несмотря на широкое применение в диагностических целях в лабораторной медицинской практике, все же не используется в классификации микробов в той степени, как этого следовало бы ожидать.

Особенно важное значение в классификации микробов следует придать методу экспериментальной изменчивости. Выявление способности

у организма расщепляться и образовывать различные формы и варианты типа модификаций или мутаций дает возможность полнее охарактеризовать его и определить границы вида.

Путем сопоставления полученных вариантов с выделенными из природы культурами можно установить их сходство, а этим — вариации вида в природе. Варианты типа мутаций показывают часто на филогенетическую связь данного вида с другими видами или даже другими родами.

Методом экспериментальной изменчивости удалось выявить родство дрожжеподобных грибов рода Sporobolomyces с дрожжами Torulopsis (Надсон и Филиппов [21], Красильников [8]); Osterle и Sthal [43] получили расы у B. mycoides, которые не отличались от B. effusus, B. olfactorius и B. nanus. Аналогичные расы у того же микроба были получены Раутенштейном [23]. Этим же методом нам [9] удалось показать взаимное родство между разными представителями лучистых грибков — актиномицетами, проактиномицетами, микобактериями и микококками, а позднее [10] — установить родство этой группы с грамположительными бактериями и микрококками. Нахимовская [2] выявила родство между оранжевой формой бактерий Ps. aurantiacus и флуоресцирующей — Ps. fluorescens. В последние годы большой интерес вызывают работы о вариантах с адаптивными энзиматическими свойствами.

Учение об адаптивных энзимах показывает, что новые ферменты появляются не только у вновь получаемых стабильных вариантов, но и в процессе приспособления микробов к новому источнику питания и к новым условиям существования.

Культуры микробов, будь то бактерии, дрожжи или грибы, при длительном нахождении в субстрате, где имеется какой-либо неусваиваемый источник питания, например, сахар, мальтоза, начинают его постепенно усваивать и употреблять как источник углеродистого питания. У данного микроба появляется расщепляющий мальтозу энзим, который не обнаруживался раньше. Этот энзим может исчезнуть, если культуру микроба снова поместить в привычную для него среду, не содержащую мальтозы.

Такие изменения описаны у очень многих микробов — бактерий, актиномицетов, грибов, дрожжей. Имеются данные, показывающие, что стойкие изменения подобного типа связаны с изменением генного набора клеток (Spiegelman [47], Маневич [16] и др.).

Кудрявцев [12] строит схему эволюции ферментативных функций у дрожжей. Шапошников [26] предлагает строить систематику микробов на основе биохимической специфики, главным образом энергетических превращений веществ в субстрате под влиянием их жизнедеятельности.

Все эти данные дают основания пересмотреть накопившийся материал о микробах с точки зрения филогенеза и строить схему эволюционной их систематики.

На основании литературных данных и собственного материала, накопившегося за 20 лет изучения бактерий и актиномицетов, мы считаем целесообразным разделить бактериальную флору на 4 отдельных класса:

Класс I — Actinomycetes
» II — Bacteriae
» III — Myxobacteriae
» IV — Spirochaetae

---

[2] Журнал «Микробиология», в печати.

Класс лучистых грибов — Actinomycetes — это монолитная, хорошо изученная группа микробов. По нашим исследованиям [10], актиномицеты родственны не только проактиномицетам, микобактериям и микококкам, но и многим грамположительным бактериям — молочнокислым, пропионовокислым и др. В 1938 г. нами было показано, что актиномицеты, проактиномицеты, микобактерии и микококки представляют собой как бы отдельные этапы эволюционного развития (рис. 1).

Характерной морфологической особенностью их является строение клеток, ветвление и смена форм в цикле развития. У актиномицетов хорошо развитый несептированный ветвящийся мицелий, на ветках формируются конидии; у проактиномицетов мицелий септированный, распадается последовательно на палочки и на кокки; у микобактерий клетки палочковидные, ветвящиеся, распадаются с возрастом на кокковидные формы; у микококков только кокковидные клетки.

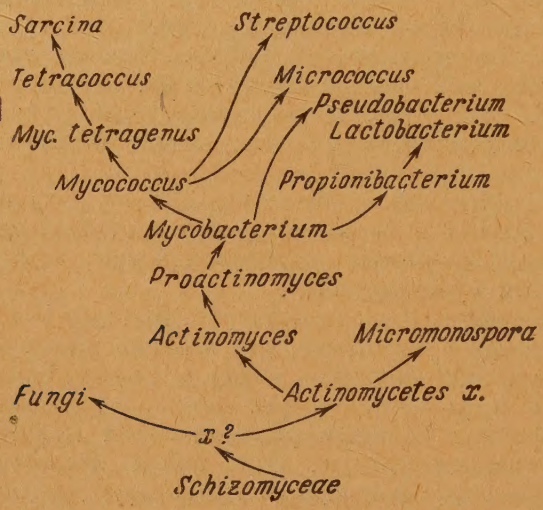

Рис. 1. Схема эволюции лучистых грибов и кокковидных бактерий

Все они грамположительны; клетки, неправильно очерченные, содержат большие включения метахроматина. Покоящиеся клетки у двух последних представителей прорастают, как конидии актиномицетов.

По строению и развитию эта группа микробов очень похожа на грибы. Если актиномицеты ближе напоминают плесневые грибы, то проактиномицеты скорее похожи на грибы с распадающимся мицелием типа Oidium и др. Микобактерии и микококки представляют параллельную группу с дрожжами и дрожжеподобными грибами.

Несмотря на это сходство, мы все же не считаем возможным объединить актиномицеты с грибами, ибо биологически они очень различны, да и цитология их имеет существенные различия. У лучистых грибков не обнаружено ни ядра, ни хондриозом, нити мицелия значительно тоньше. Возможно, что в отдаленном прошлом эти организмы имели одного неизвестного родоначальника. От него образовались две линии — грибы и актиномицеты.

В процессе эволюции микобактерии теряют способность образовывать ветки, становятся более похожими на бактерии. Если при этом и цикл развития упрощается — палочковидные клетки не превращаются в кокковидные, то тогда они с трудом отличаются или совсем не отличаются от обычных бактерий. Только способность окрашиваться по Граму и некоторые другие особенности (контурность клеток, характер-

ные внутриклеточные включения) дают возможность распознать их истинную природу.

В природе встречаются часто бактериоподобные микобактерии, которые морфологически вовсе не определяются. Они окрашиваются по Граму, неподвижны и спор не образуют; в определителях относятся к группе неспороносных бактерий. Тщательное изучение этих бактерий показало, что они представляют деградированные формы микобактерий. Родство их с последними устанавливается методом экспериментальной изменчивости. В процессе расщепления от них удается обычно получить типичные микобактериальные или близкие к ним формы. Эти бактерии мы объединяем в особый род — Pseudobacterium.

При классификации этих организмов мы придаем большое значение способности их окрашиваться по Граму.

Это внешнее проявление клеток отражает глубокую биохимическую природу их живого вещества. Henry и Stacey [35], затем Bartholomew [28] показали, что состав белков плазмы грамположительных бактерий резко отличается от состава белков грамотрицательных бактерий. Опытами установлено, что грамположительная окраска обусловлена наличием рибонуклеиновой кислоты и других невыясненных веществ — так называемой грамположительной субстанцией. При удалении этой субстанции ферментом или раствором желчи грам-окраска теряется. Клетки обесцвечиваются, как грамотрицательные бактерии. Грамположительную субстанцию можно переносить с одного вида на другой, но только на грамположительных бактерий. Она не переносится на грамотрицательных бактерий. Следовательно, надо полагать, что у грамположительных бактерий не только иной состав белков, но и основа клеток другая, резко отличная от основы грамотрицательных бактерий.

Различным составом «скелета» клеток, повидимому, объясняется различное отношение грамположительных и грамотрицательных бактерий к антибиотикам. Известно, что многие антибиотики — пенициллин, грамицидин, мицетин и др.— действуют только на грамположительных бактерий. Чувствительность последних к антибиотикам настолько постоянна и специфична, что может служить опознавательным признаком. Кореняко [6] предложила метод для диагностики микобактерий, используя чувствительность их к мицетину. В обоснование этого метода ею была проведена большая экспериментальная работа и проверка на многочисленных видах бактерий и микобактерий.

Последующие наши исследования показали, что микобактерии и грамположительные бактерии или псевдобактерии с потерей грамположительной субстанции не теряют чувствительности к мицетину. Нами были получены при расщеплении тех и других грамотрицательные варианты или расы, которые так же резко подавляются мицетином, как и исходные культуры. Это дает основание полагать, что чувствительность грамположительных бактерий обусловлена «скелетом» клеток, а не грамположительной субстанцией. У дрожжей «скелет» этот иного состава; поэтому они не чувствительны к указанным антибиотикам.

Используя все эти методы при изучении грамположительных бактерий, мы пришли к выводу, что они в основной массе близки к микобактериям и имеют один корень происхождения (рис. 1).

Пропионовокислые и молочнокислые бактерии, по данным Breit [29], Orla-Jensen и Winter [42] и др., близко родственны друг другу.

У пропионовокислых бактерий клетки имеют типичное микобактериальное строение, с хорошо выраженным ветвлением, что было отмечено еще Фреуденрейхом и затем другими авторами. Это — специализированные формы микобактерий.

У молочнокислых бактерий характерное для микобактерий строение не всегда и не у всех видов проявляется. Связывающим звеном между молочнокислыми и пропионовокислыми бактериями являются B. bifidum (Orla-Jensen и Winter [42] и др.).

Филогенетически группу лучистых грибов мы связываем с группой кокковидных бактерий — Coccaceae (рис. 1).

Микрококки, как было нами показано в 1938 г., имеют много общего с микококками — деградированными формами микобактерий. У некоторых видов микококков — M. tetragenus — клетки формируются в таблички — тетрады, напоминающие таковые у микрококков, иначе тетракокков. Тетракокки, как известно, имеют много общего с сарцинами. Имеется ряд переходных форм от тетракокков к типичным пакетообразным сарцинам. Стрептококки, повидимому, имеют разное происхождение. Одни из них произошли от микококков и микобактерий, другие — от микрококков. Lamanna [38] производит их от микобактерий (коринебактерий), а Stanier и van Niel — от молочнокислых бактерий, т. е. от представителей класса Actinomycetales.

Рис. 2. Схема филогении бактерий

Мы не исключаем возможности происхождения некоторых кокковидных организмов от других форм микробов, например от водорослей.

Плянококки, иначе подвижные кокки, безусловно имеют другие корни происхождения, возможно, что от спороносных бактерий, а может быть, от водорослей. Водные обитатели кокковидных форм, например из группы тиобактерий — Thiocapsa, Thiosarcina, Thiocystis и др., резко отличаются от настоящих кокков; происхождение их, надо полагать, другое, возможно, что от простейших водорослей — Chroococcales.

Класс Bacteriae охватывает разные формы бактерий: шаровидные, палочковидные, спиральные и нитевидные; подвижные и неподвижные; спороносные и неспороносные. По своему происхождению и биологии организмов группа эта очень разнообразная и неопределенная. В большинстве случаев даже трудно строить предположения о возможных филогенетических взаимоотношениях и корнях происхождения их. У некоторых групп, наоборот, хорошо вырисовываются контуры эволюционного развития (рис. 2).

Еще Кон, ван-Тигэм, Гансгирг и другие в прошлом столетии отмечали филогенетическую связь нитчатых бактерий с синезелеными водорослями. Различие этих организмов они находили в том, что у первых

нет фотосинтезирующего пигмента и отсутствует центральное тело в клетках. В 1932 г. Надсоном и Красильниковым была описана новая форма нитчатых бактерий — Pontothrix longissima, у которой имеется хорошо выраженное центральное тело. Единственное отличие ее от синезеленой водоросли — это отсутствие пигмента. Она авторами и названа бесцветной водорослью. Бесцветные формы с наличием центрального тела в клетках были описаны теми же авторами [41] у Anabaeniolum longeroni, выделенного из кишечника морской свинки. Chatton и Perard [30] описали бесцветную водоросль Oscillospira guilliermondii, найденную ими в кишечнике морской свинки. Этот организм, по нашим исследованиям [7], содержит центральное тело и очень близок к свободно живущей осциллярии.

Пешков [22] описал новый организм Caryophanon latum и Caryophanon tenue, очень напоминающие предыдущие организмы. Автор относит их в одну группу с Pontothrix.

Приведенные данные подтверждают связь нитчатых бактерий с водорослями.

С другой стороны, нитчатые бактерии связаны с одноклетными бактериями через промежуточные формы, которые встречаются нередко в водоемах и в почве. Характерной особенностью этих переходных форм является способность развиваться то как одноклетные формы, то как нитчатые, в зависимости от состава среды и условий роста. В водоемах они образуют длинные нити, как у Sphaerotilus, часто соединенные в большие скопления — космы, а на питательных средах в лаборатории растут, как обычные одиночные бактерии, в хорошо развитых колониях (Itzigsohn [36], Струминская [25] и др.).

В подразделении одноклетных бактерий надежными и вполне обоснованными признаками являются наличие спор, жгутиков, число и расположение последних, затем форма клеток и биохимическая специализация их. Предполагаемое филогенетическое взаимоотношение этих организмов дано в прилагаемой схеме (рис. 2).

Мы не можем согласиться с мнением Stanier и van Niel относительно объединения бактерий рода Pseudomonas со спириллами. Объединение это они делают на основании только одного признака — полярного расположения жгутиков. Придавая большое значение этому признаку, мы считаем его все же недостаточным, для того чтобы объединить столь различные организмы. Семейство Spirillaceae, повидимому, имеет, как параллельная линия, один корень с нитчатыми бактериями. Описанные у вибрионов споры, повидимому, представляют иную природу, чем споры у бактерий. По нашим наблюдениям [3], водные спириллы Sp. volutans и другие часто формируют внутренние образования, похожие на споры, путем фрагментации плазмы. По способу образования они скорее относятся к артроспорам. Во всяком случае, вопрос этот надо считать недостаточно выясненным, и поэтому мы воздерживаемся принимать его как систематический признак.

Класс Myxobacteriae подобно лучистым грибам представляет довольно хорошо очерченную и монолитную группу микроорганизмов. Особенности строения, развития, способы движения и другие признаки резко отличают эти организмы от обычных бактерий. Прежде всего, у них особое строение оболочки клеток. Она состоит из тонкого эластичного плазменного слоя, благодаря чему клетки могут изгибаться, т. е. они не ригидные, как у обычных бактерий. Клетки, по данным Имшенецкого [3] и др., имеют ядро. Движение их осуществляется по принципу обратной отдачи: локомоторных органов не имеют. Размножаются

[3] Из неопубликованных данных.

перешнуровыванием. В процессе развития формируют цисты, микроцисты, плодовые тела с разнообразным строением; окрашенные и бесцветные. По характеру строения плодовых тел и циклу развития миксобактерии разделяются на более простые и более сложные формы.

Имшенецкий [4] на основании литературного и собственного материала выделяет наиболее примитивные формы миксобактерий в отдельное семейство Promyxobacteriaceae.

У отдельных представителей этого семейства цикл развития упрощен до минимума. Клетки не образуют ни плодовых тел, ни микроцист, по строению и развитию они трудно отличаются от бактерий. Здесь, так же как и у Actinomycetes, мы видим смыкание конвергентных форм с бактериями.

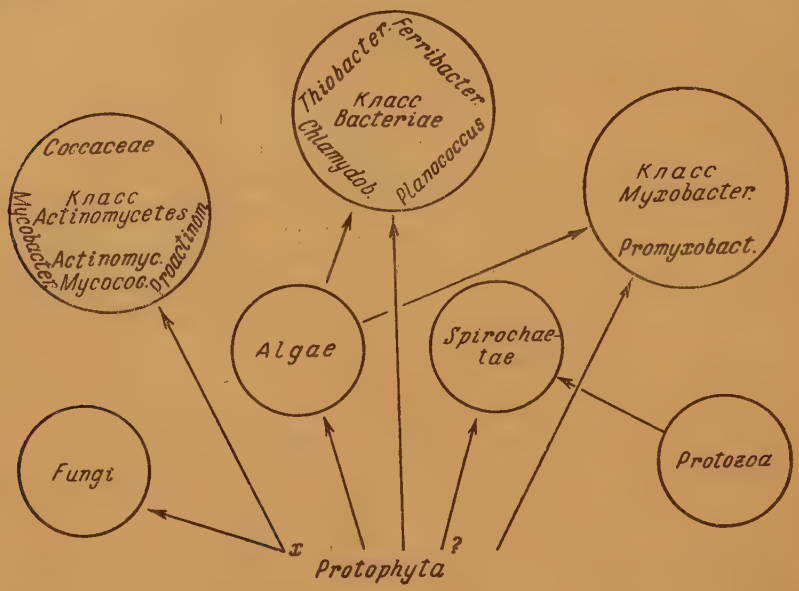

Рис. 3. Схема филогенетических взаимоотношений различных представителей микроорганизмов

Касаясь происхождения миксобактерий, Jahn [37], а затем Stanier [48] указывают на Chroococcaceae как на их родоначальников. Приспособление к сапрофитной жизни повело к утере ими хлорофилла.

Класс Spirochaetae. По строению и развитию клеток, по способу движения и вообще по биологическим особенностям организмы этого класса резко отличаются от всех рассмотренных выше групп микробов. Совершенно справедливо большинство исследователей склонны относить их к простейшим — Protozoa. Только отсутствие ядра побуждает относить их к бактериям.

Изложенный материал показывает, что микробы, именуемые в литературе бактериями, представляют очень разнородную по составу группу низших организмов. Совершенно очевидно в ней выделяются четыре самостоятельных класса, строение, развитие и происхождение которых не однородны. Три из них: лучистые грибы, бактерии и миксобактерии объединяются с низшими растениями — водорослями в одну группу простейших растительного царства — Protophyta или Schizophyta (Cohn), четвертый класс — спирохеты, повидимому, ближе примыкают к Protozoa (рис. 3).

Протофиты подразделяются на две подгруппы.

1. Schizophyceae (Cohn [31]) — организмы, имеющие фотосинтезирующие пигменты — хлорофилл, фикоциан и фикоэритрин; ассимили-

руют на свету CO_2 и синтезируют органическое вещество. Сюда относятся водоросли.

2. Schizomyceae — организмы, не имеющие фотосинтезирующих пигментов — ни хлорофилла, ни фикоциана, ни фикоэритрина. В эту подгруппу включаются указанные три класса микробов — бактерии, миксобактерии и актиномицеты (а также и грибы) (рис. 3).

Само собой разумеется, что в представленной схеме эволюции микробов мы не могли охватить все разнообразие описанных организмов.

Большая сборная группа серных бактерий —Thiobacteriales — по составу очень разнообразна и неопределенна. Такие гигантские в 50—100 μ организмы, как Achromatium и Thiophysa, с одной стороны, и мелкие формы в 2—5 μ — Thiocystis, Thiocapsa, Thiodictyon и т. д.— с другой, безусловно принадлежат к различным и друг от друга отдаленным таксономическим единицам. Первые имеют центральное тело и сходны по строению с водорослями (Надсон и Вислоух [18, 19]); вторые, повидимому, ближе примыкают к бактериям. Для нас не ясно положение и других представителей этой группы.

Точно такое же неопределенное положение у представителей порядка Ferribacteriales — одноклеточных железобактерий, а последние исследователи еще более запутали этот вопрос. Вообще данная группа мало изучена.

Многие другие сомнительные или малоизученные формы не включаются в представленные схемы, например, подвижные микобактерии и проактиномицеты; представители Caulobacteriales — Newskia, Hyphomicrobium и др. (см. определитель Берже, 1939). Все эти и подобные им организмы должны быть подвергнуты тщательному изучению.

Выводы

Имеющийся в литературе материал и собственные многолетние наблюдения дают основание рассматривать микробы, именуемые бактериями, как растительные организмы. Они вместе с водорослями составляют группу низших растений — Protophyta.

Исключение составляют спирохеты, которые ближе примыкают к Protozoa.

Протофиты подразделяются на две подгруппы:

I. Schizophyceae — водоросли с зеленым или сине-зеленым пигментом; синтезируют на свету органическое вещество, ассимилируют углекислоту.

II. Schizomyceae — организмы, не имеющие фотосинтезирующего пигмента. Подразделяются на 3 класса — актиномицеты, бактерии и миксобактерии.

Класс Actinomycetes подразделяется на три порядка:

1) Порядок Actinomycetes
   Семейство Actinomycetaceae
   » Micromonosporaceae
2) Порядок Mycobacteriales
   Семейство Mycobacteriaceae
3) Порядок Coccaceae
   Семейство Coccaceae

Класс Bacteriae имеет четыре порядка:

1) Порядок Bacteriales
   Семейство Planococcaceae
   » Pseudomonadaceae

Семейство Chlorobacteriaceae
» Bacteriaceae
» Bacillaceae
» Spirillaceae
2) Порядок Ferribacteriales
Семейство Ferribacteriaceae
3) Порядок Thiobacteriales
Семейство Achromaceae
» Thiocapsaceae
» Chromaceae
» Rhodocapsaceae
4) Порядок Chlamydobacteriales
Семейство Chlamydobacteriaceae

Класс Myxobacteriae имеет один порядок:

1) Порядок Myxobacteriales
Семейство Myxococcaceae
» Archangiaceae
» Polyangiaceae
» Sorangiaceae
» Promyxobacteriaceae

Класс Spirochaetae имеет один порядок:

1) Порядок Spirochaetales
Семейство Spirochaetaceae

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 12.II.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Залесский М. Естественная история одного угля. Тр. Геол. комис., Новая серия, вып. 139, 1915.
2. Израильский В., Рунов Е. и Бернард В. Клубеньковые бактерии и нитрагин. Москва, 1933.
3. Имшенецкий А. Строение бактерий. Москва, 1940.
4. Имшенецкий А. и Солнцева Л. О несовершенных формах миксобактерий. Микробиология, т. XIV, стр. 220, 1945.
5. Комаров В. Учение о виде у растений. Москва, 1940.
6. Кореняко А. Биологический метод распознавания микобактерий. ДАН СССР, т. XXIII, № 2, стр. 186, 1939.
7. Красильников Н. Микробы кишечника морской свинки. Микроб. журн. т. 8, № 3, 1928.
8. Красильников Н. Образование рас у Sporobolomyces phillipovi n. sp. Изв. Акад. Наук СССР, сер. биол., № 10, стр. 1469, 1933.
9. Красильников Н. Лучистые грибки и родственные им организмы. Москва, 1938.
10. Красильников Н. О классификации лучистых грибков — Actinomycetales. Микробиология, т. XIV, вып. 3, 1945.
11. Красильников Н. Понятие о виде у бактерий. Микробиология, т. XVI, вып. 5, 1947.
12. Кудрявцев В. Эволюция ферментативных свойств у дрожжей рода Saccharomyces. Микробиология, т. VIII, вып. 3—4, 1939.
13. Кудрявцев В. О принципах классификации микроорганизмов. Микробиология, т. XI, вып. 1—2, 1942.
14. Кудрявцев В. и Косиков К. Наследование ферментативных свойств у некоторых межвидовых гибридов рода Saccharomyces. Микробиология, т. XVI, стр. 477, 1947.
15. Курсанов Л. Понятие о виде у низших растений. Микробиология, т. XIV, стр. 210, 1945.
16. Маневич Э. Наследственность аскомицетовой плесени Neurospora crassa. Успехи Совр. биол., т. XXII, вып. 2, 1946.
17. Мишустин Е. Эколого-географическая изменчивость почвенных бактерий. Москва, 1947.

18. Надсон Г. О серных бактериях Thiophysa и Thiosphaerella. Микроб. Журн., т. I, № 1—2, 52, 1914.
19. Надсон Г. и Вислоух С. Строение и жизнь гигантской бактерии Achromatium exaliferum. Изв. Гл. Ботан. сада, т. XXII, № 1, 1923.
20. Надсон Г. и Красильников Н. Строение и развитие Pontothrix longissima — бесцветной водоросли из группы нитчатых бактерий. ДАН СССР, стр. 243, 1932.
21. Надсон Г. и Филиппов Г. Об образовании новых стойких рас микроорганизмов под влиянием рентгеновских лучей. Рентгенорасы Sporobolomyces. Вестник рентген. и радиол., т. X, стр. 275, 1932.
22. Пешков М. Филогения новых микробов Caryophanon latum и Caryophanon tenue — организмов, промежуточных между цианофицеями и бактериями. Журн. общей биол., т. I, вып. 4, 1940.
23. Раутенштейн Я. Изменчивость B. mycoides I, Морфология вариантов. Микробиология, т. XV, вып. 4, 1946.
24. Розанова М. Экспериментальные основы систематики растений. Москва, 1946.
25. Струминская Е. Зооглейные бактерии мезосапробной и полисапробной зон «Косматая Зооглея». Микробиология, т. VIII, стр. 239, 1939.
26. Шапошников В. О значении физиологических признаков в систематике микроорганизмов. Микробиология, т. XI, вып. 1—2, 1942; т. XIII, вып. I, 1944.
27. Ярмоленко А. Об ископаемом актиномицете. Тр. Ботан. ин-та Акад. Наук СССР, сер. II, вып. 2, стр. 389, 1934.
28. Bartholomew J. and Umbrait W. Ribonucleic acid and the gram Stain. J. Bacter., v. 48, No. 5, 1944.
29. Breit E. Studien über die Darmflora des Menschen. Dissert. Kiel. Ref. Biol. Abstr., v. 10, No. 5, 1936.
30. Chatton E. et Perard Ch. Schizophytes du caecum du cobay I. Oscillospira guilliermondi n. g. n. sp. C. R. Soc. de Biol., t. LXXIV, No. 20, p. 1159, 1913.
31. Cohn F. Untersuchungen über Bakterien. Beitr. Biol. Pflanz. Bd. I, S. 127, 1872; H. 3, S. 141, H. 2, S. 249, 1876.
32. Coleman M. a. Reid J. A. serological study of strain of Alcaligenes radiobacter and Phytomonas tumefaciens in the «M» and «S» phases. J. Bact., v. 49, p. 187, 1945.
33. De Bary A. Vergl. Morph. und Biol. der Pilze Mycetozoa und Bakterien, Leipzig, 1884.
34. Ehrenberg C. Die Infusionstierchen als volkommene Organismen, Leipzig, 1838.
35. Henry H., Stacey M. and Tecce E. Nature of the gram-positive complex in microorganismus. Nature, v. 151, p. 675, 1943; v. 156, p. 721, 1945.
36. Itzigsohn H. Sitzungsberichte der Gesellsch. Naturforsch. Freunde am 19 November 1867.
37. Jahn E. Beiträge zur botanischen Protistologie. I. Die Polyangiden. Leipzig, 1924.
38. Lamanna C. A non-life cycle explanation of the diphtheroid streptococcus from endocarditis. J. Bacter., v. 47, No. 4, 1944.
39. Migula W. System der Bakterien 1897—1900.
40. Müller O. Animalcula infusoria et marina, Hauniae, 1786.
41. Nadson G. et Krassilnikoff N. Schizophytes du caecum du cabaye; Anabaeniolum C. R. Sea. Acad. Sci., t. 187, p. 176, 1928.
42. Orla-Jensen S. a. O. Winter. Bacterium bifidum und Thermobacterium intestinale, Ctbl. Bact., Abt. II, Bd. 93, S. 321, 1935.
43. Osterle P. und Stahl C. Untersuchungen über den Formenwechsel und die Entwicklungsformen bei B. mycoides. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 79, S. I, 1929.
44. Osterman E. a. Rettger L. A comparative study of organisms of the friedlander and coli-aerogenes groups. J. Bacter., v. 42, No. 6, 1941.
45. Perty M. Zur Kenntnis kleinster Lebensformen. Bern, 1852.
46. Petrie F. A. typical acid-fast microorganisms. II. Desoxyribonucleic acid content. J. Bact., v. 51, No. 4, 1946.
47. Spiegelman S. The physiology and genetic significance of enzymatic adaptation. Ann. Mics. Bot. Gard., v. 32, No. 2, 1945; J. Bact., v. 49, No. I, 1945.
48. Stanier R. Studies on the Cytophagas. J. Bact., v. 40, p. 619, 1940.
49. Stanier R. a. van Niel C. The main outlines of Bacterial classification. J. Bact., v. 42, No. 4, 1941.
50. Winge O. and Laustsen O. On the new yest types produced by hybridization. C. R. Lab. Carlsb., v. 22, No. 21, No. 22, 1939; v. 23, No. 2, 1940.
51. Zopf Q. Die Spaltpilze. Encyklop. der Naturwiss., Abt. I. Lief. 32, 1883.

О БИОГЕННОМ ОБРАЗОВАНИИ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ[1]

Б. Л. Исаченко

О роли микроорганизмов в образовании некоторых минералов, относимых к числу биолитов, накопилось довольно много наблюдений, не всегда, однако, связанных с описанием непосредственной роли в их образовании микроорганизмов. Исследования Бруссова представляют в этом отношении исключение.

В своем сообщении я и хотел бы обратить внимание на эту мало разработанную область, в которой микробиологии необходимо подойти к решению вопросов, входящих до сих пор преимущественно в сферу исследований минералогов, высказавших много серьезных соображений о биологических факторах в образовании биолитов. Идеи, внушенные критическим использованием накопленного материала, могут быть правильными, однако для их упрочения нужны опыты. С этого времени, писал Виноградский, начинается их право гражданства в области точного знания.

На рождении кальцита, пользуясь выражением Ферсмана, я остановился потому, что, хотя вопрос об осадках углекислого кальция освещен в литературе достаточно полно, некоторые стороны, непосредственно связанные с отложением карбоната в телах бактерий или в их выделениях, нуждаются еще в освещении с микробиологической стороны.

Участие микробиологов в разработке вопросов, связанных с образованием и выветриванием минералов или камня, иначе говоря рождения, роста и смерти минералов (Ферсман), поможет подметить то, что иногда ускользает от взгляда специалиста, изучающего косную материю.

Связь между образованием осадков углекислого кальция и растительными организмами подмечена давно (1818), что послужило для чешского ученого Prát [18] основанием для развития учения о биолитогенезе. Но в его большой монографии не отведено соответствующего места значению микроорганизмов. Между тем в исследованиях Надсона [9] установлена впервые связь между развитием определенных бактерий в чистых культурах и образованием кристаллов углекислого кальция; Drew [14] описал Bacterium calcis, вызывающий выпадение карбоната в теплых морях. С биологическим отложением карбоната связано образование Багамских островов (Бавендамм). Молиш [17] дал описание и изображение кристаллов углекислого кальция, образующихся в культурах бактерий, выделенных им из морской и пресной воды; у ряда других исследователей можно найти подобные уже указания. Бруссов [13], исследуя термы Аахена, подошел ближе своих предшественников к описанию микробиологической стороны отложения углекислого кальция в теле (оболочке) бактерий.

Соображения о химической и физической сторонах процесса отложения карбоната имеются у многих авторов, они нашли выражение в работах геологов и биологов.

При объяснении генезиса известняков и, в частности, травертина появились две крайние теории; одна — объясняла выпадение углекис-

[1] Доложено на заседании Биологического отделения Академии Наук СССР 26 октября 1947 г.

лого кальция физическими причинами при изменении внешних условий, когда вода выходит на поверхность земли (температура, давление и т. п.), другая, высказанная впервые Murray и Jervine (1889), объясняла на основании поставленных ими опытов отложение карбонатов образованием углекислоты и углекислого аммония при гниении, т. е. наличием биологических процессов. Эта теория нашла развитие во многих работах биологов и встретила признание со стороны некоторых геологов, тогда как другие придерживались того мнения, что бо́льшая часть известняков не связана в своем происхождении с биологическими процессами (Heim, Emig и др.).

Вероятнее всего, что оба взгляда правильны, так как возможность образования отложений углекислого кальция тем и другим путем не исключена, и вопрос поэтому принимает характер количественного определения в конкретном случае значения каждого из факторов, которое может быть различным в зависимости от внешних условий.

Нами были поставлены опыты: одни в природных условиях — в термальных источниках Пятигорска [2], вокруг которых происходило отложение углекислого кальция, переходящего с возрастом в травертины [3] (рис. 1), другая серия опытов была произведена в лаборатории с культурами бактерий, выделенными из горячих источников или из воды оз. Севана (Армения).

Постановка опытов в источниках состояла в том, что в деревянных лотках, поставленных вдоль вытекающей струи, были укреплены колышки, на которых должны были постепенно откладываться осадки карбонатов, подлежащие затем микробиологическому исследованию. Процесс обрастания колышков шел вообще довольно быстро, и исследование отложений можно было начинать с первых же 2—3 дней. Карбонаты со всех сторон покрывали колышки густо сидящими длинными сростками кристаллов (рис. 2). Положенные в лоток камни или кирпичи тоже покрывались осадками, но медленнее, и они имели вид плоских налетов, состоящих из мелких кристаллов.

Исследуя кристаллы, образующиеся по склону горы со стекающей по ней водой Лермонтовского источника, можно было обнаружить их биогенное происхождение и строение. При растворении кристаллической массы соляной кислотой оказывалось, что она состояла из тонких нитей грибов без признаков плодоношения; на нитях были скопления бактерий различной формы и величины, а на этой основе происходило отложение карбоната. Такие же нити гриба и бактерий покрывали листья растущих здесь растений, на которых шло образование известковых корок.

Поставленные в лотки колышки с первого же дня покрывались палочкообразными и коккообразными бактериями, отлагающими обильное слизистое вещество. В бактериальной слизи с первых же дней появлялись круглые тельца различного размера, от мелких едва заметных капель до крупных тел. Эти капли и тельца представляют собой не что иное, как аморфный углекислый кальций, являющийся зародышем кристаллов, которые и не замедлили появиться.

Уже через 7—8 дней погруженные в воду предметы оказывались сплошь покрытыми затвердевшей кристаллической массой.

Такие же плотные массы кристаллического углекислого кальция покрывают каменную кладку стенок канала, по которым стекает вода источника, но эти отложения настолько уже тверды, что отбить их можно только долотом. Плотность отложений больше там, где ток воды стремительнее, а там где он медленнее, осадки рыхлые и содержат

---

[2] Эти опыты были поставлены при любезном содействии О. Ю. Волковой.

[3] Травертин — горная порода — от старого римского названия города Tivoli в Италии.

большие количества вкрапленной в известковые отложения аморфной серы. В образовании этой серы принимают участие, помимо тионовокислых бактерий, пурпурные серобактерии, образующие местами розовые пятна.

Кирпичи, положенные в лотки в Пушкинском источнике (температура 49°), покрываются на 3-й день пористым белым налетом, состоящим из кристаллических призматических тел, внутри которых также находятся бактерии и кокки, окруженные слизью. Слизь эта сохраняется на образовавшихся в культурах кристаллах, покрывая их со всех сторон, но потом она исчезает (рисунки 3 и 4).

Бактерии, выделенные из тех мест, где происходит отложение углекислого кальция, безразлично, из горячих ли источников, из травертинов или из воды оз. Севан, хорошо развиваются на всех обычных средах. Для получения ясной картины отложения кристаллов углекислого кальция вполне пригодна среда Молиша. Мы ее приготовляли из 1 л воды источника, откуда нужно было выделить культуры, с добавлением 10 г пептона, 5 г глицерина, а в тех случаях, когда воду брали из водопровода, к ней добавляли 10 г хлористого кальция. Для приготовления твердой среды добавляли агар.

В чашках Петри, или лучше Коха, с налитой средой Молиша, при температуре 28—30°, засеянной культурами бактерий или исследуемой водой, образуется бактериальная пленка, в которой кристаллы карбоната появляются уже по прошествии нескольких дней. Число их быстро увеличивается, они частично падают на дно, образуя обильный осадок. В этом осадке, кроме кристаллов самой разнообразной формы, находятся оолиты с концентрическими слоями и сферолиты с радиальным строением, отличающиеся по составу от оолитов адсорбированной фосфорной кислотой. Во всех этих образованиях, действуя соляной или уксусной кислотой, можно обнаружить бактерий, окруженных обильной слизью [4]. Бактериальная слизь, являясь адсорбирующим веществом, служит местом первоначального отложения углекислого кальция. Отложение его появляется в культурах, как и в воде терм, сначала в виде небольших каплеобразных телец, постепенно под влиянием селективной адсорбции увеличивающихся в размерах. В том, что образовавшиеся тельца действительно не что иное, как откладывающийся аморфный карбонат, убеждает и в этом случае их растворимость в кислотах. Таким образом, отложениям углекислого кальция в культурах на первой стадии присущ аморфный характер. Образовавшиеся аморфные тела круглой или овальной формы окружены наружной более плотной оболочкой, которая несколько дольше выдерживает действие соляной кислоты. Так как образование аморфных телец карбоната происходит в бактериальной слизи, то возможно, что и она входит в состав наружного слоя, придавая ему бóльшую сопротивляемость растворителям.

Образовавшиеся аморфные тела дают конкреции, в которых можно наблюдать отдельные составляющие их тельца с заключенными внутри бактериями, а вся конкреция окружена такой же оболочкой, как и у составляющих ее аморфно-коллоидальных телец (рис. 5). Эти тельца («глыбки») имеют, повидимому, характер так называемого коллоид-кальцита.

Помимо коллоидных телец и конкреций, в культурах образуются оолиты с концентрически расположенными слоями. Так как в культурах были только молодые образующиеся оолиты, поэтому лучистое строение, о котором говорят некоторые авторы, в них еще не появлялось [5].

---

[4] А. Г. Вологдин указывал на включение бактерий в оолитовые структуры кембрийских известняков [3].

[5] Возможно, что́ оно появлялось с адсорбцией фосфорной кислоты и переходом оолита в сферолит.

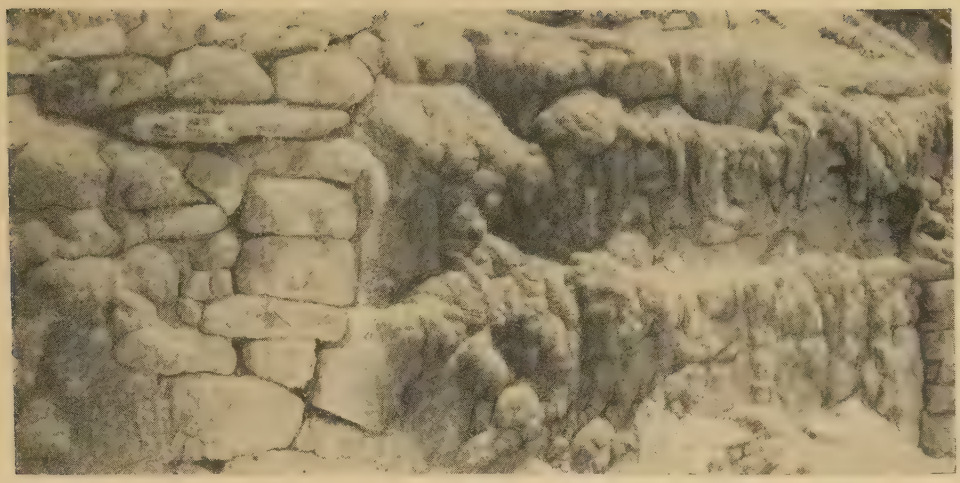

Рис. 1. Отложение карбонатов кальция вдоль стекавшей воды (Пятигорск, Лермонтовский I, б. Ал. Ермоловский)

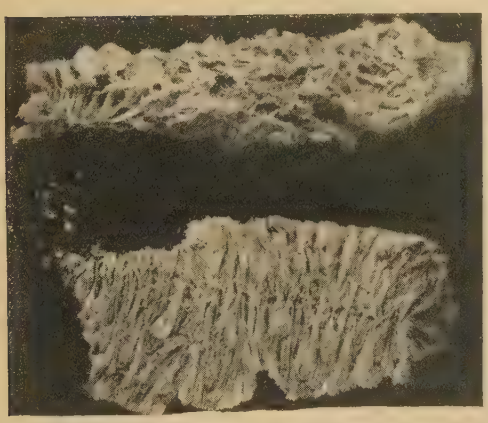

Рис. 2. Кристаллические отложения карбонатов в опытах, поставленных в Народном (б. Товиевском) источнике в Пятигорске

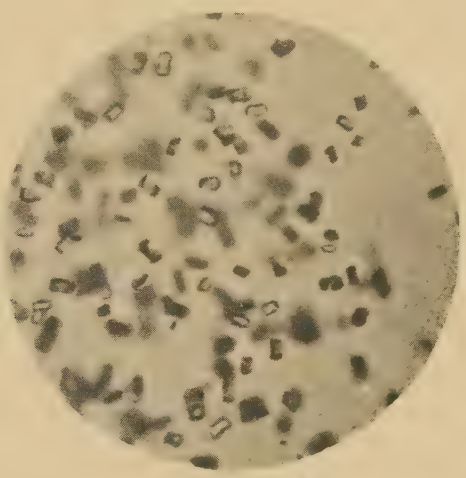

Рис. 3. Отложение кристаллов углекислого кальция в молодых культурах бактерий из оз. Севан (Армения)

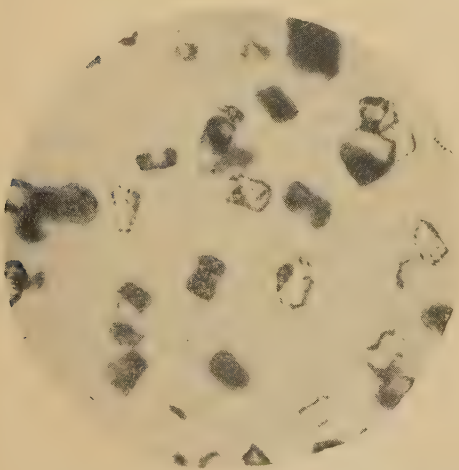

Рис. 4. То же при большем увеличении. Вокруг кристаллов видна бактериальная слизь (увеличено в 80 раз)

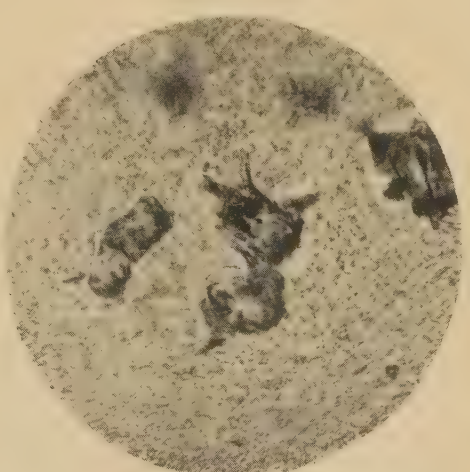

Рис. 7. Кристаллы углекислого кальция в старых культурах бактерий из оз. Севан

То, что было описано как ядро оолита, оказывалось обычно коккообразной клеткой бактерий в начинающем формироваться оолите или скоплением нескольких коккообразных клеток, окруженных слизью, являющихся, таким образом, центрами, вокруг которых в культурах шло отложение углекислого кальция.

Появляющиеся в культурах сферолиты или сферолиты с ясно выраженной радиально-лучистой структурой встречались не столь часто, как оолиты.

Биогенное образование оолитов дает возможность утверждать, что древние отложения углекислого кальция, содержащие оолиты, микробиогенного происхождения.

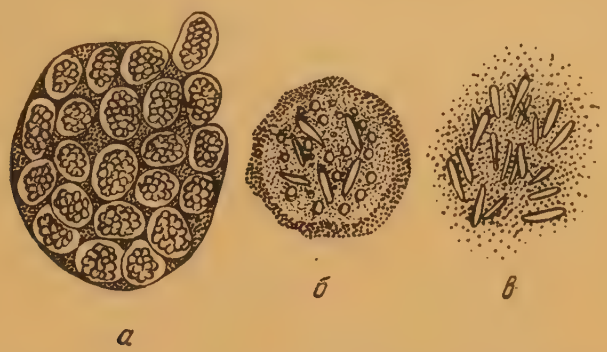

Рис. 5. *а* — отложение углекислого кальция в виде „глыбок", лежащих в бактериальной слизи; *б* — отдельная „глыбка" в начале действия на нее 5% соляной кислоты; *в* — остатки бактериальной слизи с бактериями, остающиеся на месте растворенной „глыбки"

Следующая стадия, которую можно наблюдать в культурах, заключается в переходе коллоид-кальцита в кристаллическое состояние; это стадия, нормально следующая за коллоидной, причем переход коллоидного состояния в кристаллическое имеет промежуточную стадию — более плотного коллоида, медленнее растворяющегося по сравнению с только что образовавшимся аморфным коллоидом. Этот переход сопровождается потерей коллоидом воды; быстрота перехода связана с температурой.

В термах с температурой (47—49°) начало кристаллизации наблюдается на 2—3-й день, в термостатах с более низкой температурой (28—30°) оно несколько запаздывает. Форма образующихся кристаллов весьма различна: от мелких кристаллов и ромбоэдрических призм, принимаемых за кристаллогидрат кальция $CaCO_3 \cdot 5H_2O$, сходных с кристаллами у диатомовых водорослей (Wallner), до больших кристаллов, образующих сростки и друзы самой различной формы (рис. 6). Размеры кристаллов с возрастом культуры значительно увеличиваются (рис. 7).

При радиографическом исследовании кристаллов они оказались состоящими из кальцита и изредка из арагонита. Образование арагонита связано, как утверждают сторонники физической теории, с более высокими температурами, а кальцита — с низкими; сторонники биологической теории объясняют образование тех или других карбонатов деятельностью различных организмов. Вопрос нуждается в дальнейших исследованиях.

В колониях бактерий, развивающихся на твердых питательных средах, образование коллоидного студня заметно в виде широкого налета вокруг всей колонии и кристаллов и оолитов, появляющихся на ее по-

верхности. Постепенно вся колония оказывается окруженной скоплениями кристаллов, образовавшихся из коллоидального студня. В общем, наблюдается картина, сходная с отложением серы, описанная мной у тионовокислых бактерий (Исаченко [4, 5]).

Отложение углекислого кальция происходит, как видно из всего сказанного, совершенно одинаково: наблюдаем ли за ним в горячих источниках или в культурах бактерий. Отложение кристаллов происходит, однако, только при наличии определенных бактерий и в непосредственной связи с ними или образуемой ими слизи. Без бактерий нет отложений в культурах углекислого кальция. Отложение карбоната появляется в культурах, например: Proteus vulgaris, Bacillus mycoides, Bacterium calcis, Bacterium sewanensis и в культурах бактерий, выделенных нами из горячих источников и оз. Севан[6]. Отложение карбоната происходит также на корнях растений, покрытых актиномицетами и бактериями (Красильников, [7]); наблюдалось отложение карбонатов дрожжами, на водорослях, листьях мхов и различных растений; однако, по исследова-

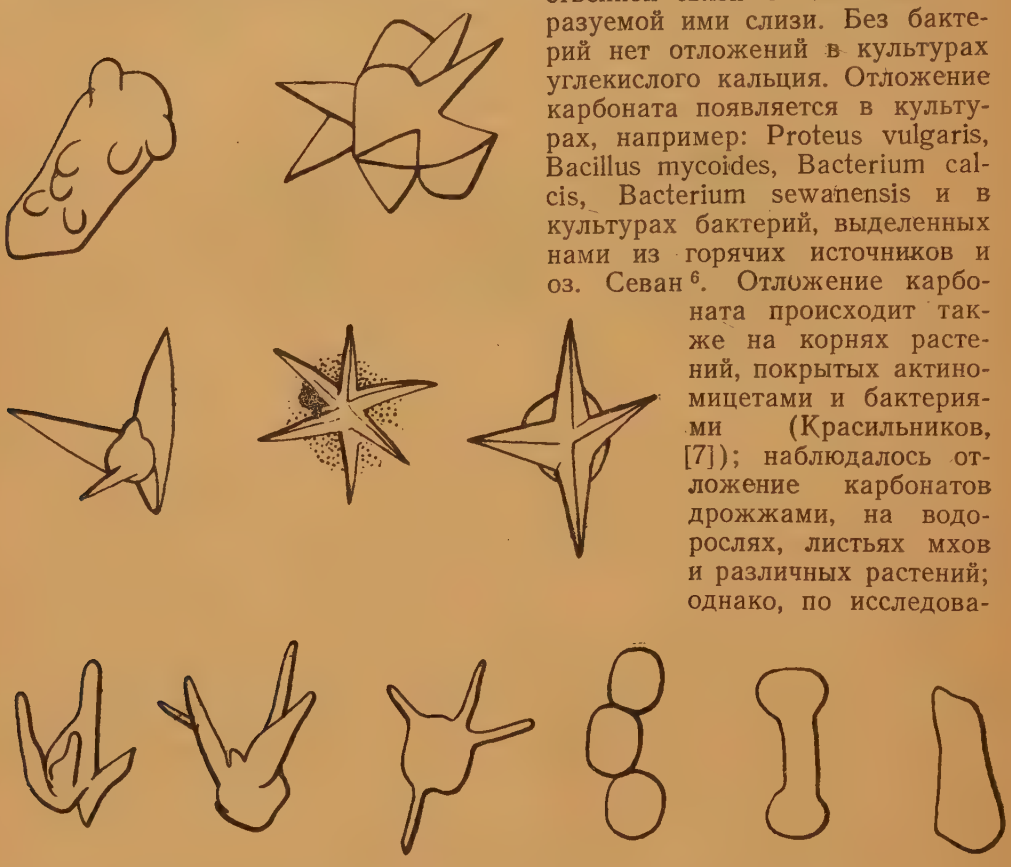

Рис. 6. Кристаллы различной формы, наблюдавшиеся в 2-месячных культурах бактерий из оз. Севан (увеличено до 300 раз)

ниям Geitler [15], отложение углекислого кальция на водорослях Rivulariaceae происходит в слизи, образуемой бактериями; это же соответствует наблюдениям Kořinek [16], описавшего бактерию, выделенную им с поверхности синезеленой водоросли. У кораллов, моллюсков, ракообразных и других слизистые клетки эктодермы также выделяют сначала аморфный коллоидный углекислый кальций, потом кристаллизующийся.

Повидимому, во всем живом мире отложение карбоната происходит по одной схеме — сначала наблюдается появление аморфного карбоната, потом коллоида-кальцита, а затем наступает его кристаллизация

[6] Они мало отличаются от описанных Калантарианом [6] и Петросяном.

Выделение культур из оз. Севан и наблюдение за отложением в них карбонатов выполнила при наших исследованиях Е. А. Дьякова.

Тесная связь между жизнью организмов и отложением кальция нашла отражение в формулировке, сделанной еще с древности: «omne calx e vermibus», или, несколько изменяя ее, можно теперь сказать: «omne calx e vivo». Этим, конечно, не отрицается значение физико-химических факторов в отложении кальция, но подчеркивается лишь значение непрерывно действующего биологического фактора, наличием которого можно объяснить образование известковых отложений еще в докембрии. Результаты действия биологического фактора мы видим в образовании мощных отложений осадков — дрюита в тропических морях, приписываемых Дрю деятельности Bacterium calcis. Образование в Караибском море Богамских островов тесно связано с деятельностью бактерий (Bavendamm [11]). Прослойки в фазеолиновом илу дрюита в осадках Черного моря, по Архангельскому, обязаны тоже деятельности бактерий (бактериальный кальций). Им же можно приписать образование комочков аморфной углекислой извести, обнаруженных на дне Черного моря Андрусовым [1]. То же самое наблюдается в соляных грязевых озерах (Тамбуканском) и в одесских лиманах.

В высокогорном оз. Севан (в Армении) покрывающий дно озера конгломерат цементирован углекислым кальцием в твердую сплошную массу. Выделенные нами из воды озера бактерии быстро развивались в культурах и откладывали массы кристаллов и оолитов. Для выявления цементирующих свойств образуемого ими коллоидального карбоната были поставлены специальные опыты. Сущность их заключалась в том, что на простерилизованный песок, положенный в чашки Петри, наливалась питательная среда с культурой выделенной из озера бактерии. По прошествии 3—4 недель образовавшийся углекислый кальций схватывал отдельные песчинки и цементировал их наподобие более или менее плотных конкреций. То же самое, повидимому, происходит и в озере, где в результате цементирования донной гальки образуется плотная твердая масса, покрывающая дно непроницаемым для фильтрации воды слоем. Цементирование песчинок и, очевидно, гальки в озере наступает при переходе бактериального коллоидного карбоната, покрывающего дно озера, в кристаллическое состояние, превращая тем донные отложения в непроницаемый пласт. Кристаллики углекислой извести, имеющие различную величину, оолиты и друзы встречаются в грунтах озера в изобилии (Афанасьев).

Отложение коллоидного карбоната происходит не только вне бактериальной клетки, в ее слизи, но описаны случаи отложения его внутри бактериальной клетки. Так, Bersa [12] обнаружил внутри клеток пурпурных серобактерий в вакуолях коллоидный карбонат, который после отмирания клетки освобождается и может кристаллизоваться вне ее.

По наблюдениям Бруссова, углекислый кальций отлагается в оболочке исследованных им бактерий. На этом основании Бруссов предполагает, что выпадение кальция в море, о котором говорит Дрю, происходит не в виде свободного дрюита, а вместе с телами бактерий.

Таково разнообразие способов отложения углекислого кальция, связанного с развивающимися бактериями. Естественно возникает вопрос: в какой степени он связан с жизнью самих бактерий, в каких физиологических процессах он участвует? Точно это еще не известно; не исключена возможность, что для некоторых гетеротрофных бактерий процесс адсорбции карбоната является как источником углерода, так и энергии, освобождающейся при переходе коллоида в кристаллическое состояние.

Интересно вспомнить, что на сходство углекислой извести, выделяющейся в виде «зерен, имеющих особое наслоенное строение», с зернами крахмала указывал еще Фаминцин [10]. Придавая этому наблюдению особое значение, Менделеев писал, что оно имеет не только самостоя-

тельное значение, но и представляет пример получения минерального вещества в такой же точно форме, в какой были известны до сих пор органические вещества, вырабатываемые в растениях.

Минеральные коллоиды, писал в это же время ученик Сеченова физиолог Михайлов [8], подобны в состоянии студней осадкам белков, они сближаются с органическими. Нельзя не обратить внимания на то, что ботаник, химик и физиолог пришли к одному и тому же заключению, подтвержденному позднейшими наблюдениями.

Только теперь можно сказать, что старые наблюдения, оставшиеся мало известными, показывают, что нет принципиального различия в строении оолитов, образуемых бактериями, и образуемого растениями крахмала. Как углекислый кальций, так и крахмал могут служить примером источников энергии, сохраняющихся на земле в потенциальном состоянии. Количество отложенного на земном шаре карбоната в виде известняка, по подсчетам Прата, могло бы покрыть поверхность земли слоем толщиной 60—120 м, а, по Кларку, в море ежегодно образуется приблизительно 1400 млн. тонн известняка. Крупное значение организмов в связывании углекислоты в виде биолитов несомненно. Подобно тому, как зеленые растения связывают углекислоту в органических веществах, бактерии и другие бесхлорофильные организмы связывают ее в образуемых ими минеральных телах.

Выводы

1. Выделение бактериями углекислого кальция (в виде кальцита и арагонита) широко распространено в природе как в горячих источниках, так и в пресных и соленых водоемах. Таким же путем могли образоваться и древние докембрийские известковые отложения.

2. Начальная стадия образования углекислого кальция как в природных условиях, так и в бактериальных культурах происходит в слизистых выделениях бактерий. Она выражается прежде всего в появлении аморфных телец углекислого кальция, внутри которых можно обнаружить бактерий.

3. Аморфный углекислый кальций переходит в коллоид-кальцит и в кристаллическое состояние. При этом образуются кристаллы различной формы (призмы, друзы), оолиты, сферолиты. Вокруг кристаллов вначале заметны остатки слизи. Внутри кристаллов включены бактерии.

4. Углекислый кальций при переходе из коллоидального состояния в кристаллическое обнаруживает цементирующее свойство, скрепляя донные отложения (например, в оз. Севан) в плотную массу.

5. Вследствие бактериальной деятельности происходит образование травертина (биолитогенезис) и, несомненно, многих морских осадков коллоидального или кристаллического характера (дрюит), описанных в свое время Андрусовым, Архангельским и другими.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 30.X.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Андрусов Н. И. Некоторые результаты экспедиции «Черноморца». Изв. Импер. Русского географического общ., XXVIII, 1892.
2. Архангельский А. Д. Об осадках моря. Бюлл. Московск. общ. испыт. природы, V, № 3—4, 1927.
3. Вологдин А. Г. Геологическая деятельность микроорганизмов. Изв. АН СССР, Серия геолог., № 3, 1947.
4. Исаченко Б. Л. Микробиологические исследования над грязевыми озерами. Глава XI. Бактериологическое выпадение кальция. Тр. Геолог. комитета, нов. серия, вып. 148, 1927.

5. Исаченко Б. Л. и Салимовская А. Г. Морфология и физиология тионовокислых бактерий. Изв. Гос. гидрологического ин-та, 1928.
6. Калантарьян П. (Kalantarian P. u. Petrossian A.) Ueber ein neues kalkfällendes Bakterium aus den Sewan-See (Goktschasee). Bact. Sewanense. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 85, S. 431, 1931—1932.
7. Красильников Н. А. Лучистые грибки и родственные им организмы. Изд. АН СССР, стр. 291, 1938.
8. Михайлов В. П. О студенистом состоянии белковых тел. Журн. Русск. физ.-хим. общ., 1888 (Отд. издание).
9. Надсон Г. А. (Nadson G.) Beitrag zur Kenntnis der bakteriogenen Kalkablagerungen. Arch. Hydrob., Bd. XIX, S. 154, 1928.
10. Фаминцин А. (Famintzin A.) Studien über Krystalle und Krystallite. Mémoire de l'Acad. Imp. Sci. St. Pétersburg, VII, t. XXXII, No. 10, 1884. Amylumartige Gebilde des kohlensauren Kalkes, Verh.-nat.-hist. med. Vereins zu Heidelberg. 1889.
11. Bavendamm W. Die mikrobiologische Kalkfällung in der tropischen See. Arch. Mikrob., Bd. 3, H. 2, S. 205, 1932.
12. Bersa E. Ueber das Vorkommen von kohlensaurem Kalk in einer Gruppe von Schwefelbakterien. Ber. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 44, S. 474, 1926, u. Sitzungsber. Ak. Wiss. Wien., Math-nat. Kl. Abt. I, 1920.
13. Brussoff A. Ueber ein kalkspeicherndes Bakterium und die von ihm gebildeten «Kristalle». Arch. Mikrob., Bd. 4, H. 2, S. 170, 1933.
14. Drew H. On the precipitation of calcium carbonate in the sea by marine Bacteria. Papers from the Tortugas Labor. of the Carnegie Inst. of Washington, v. V, p. 7, 1914.
15. Geitler L. Cyanophyceae — A. Pascher's «Die Süsswasserflora von Deutschland», H. 12, S. 42, 1925.
16. Kořinek J. Ueber die Bakteriensymbiose der Oscillatorien. Arch. Protistenkunde, Bd. 64, H. 1—2, 1928.
17. Molisch K. Ueber Kalkbakterien und andere kalkfällende Pilze, Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 65, S. 130, 1925.
18. Prát S. Biolithogenèse. Prague. 1929.

О ВЛИЯНИИ СТЕРИНОВ НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

I. О ФИЗИОЛОГИЧЕСКОМ ЗНАЧЕНИИ ЭРГОСТЕРИНА ДЛЯ ДРОЖЖЕЙ И ЭНДОМИЦЕТОВ

Т. А. Таусон

Стерины — одноатомные высокомолекулярные спирты, имеющие в основе молекулы фенантреновое ядро, широко распространены в природе.

В животных и растительных организмах они встречаются как в свободном состоянии, так и в виде эфиров (главным образом высших жирных кислот), а в последнее время в высших растениях они обнаружены и в виде глюкозидов. Наиболее изученными из них являются холестерол $C_{27}H_{46}O$ и эргостерол $C_{28}H_{44}O$. Тот или иной стерол редко встречается в животном или растительном организме в чистом виде.

По большей части исследуемые объекты содержат смеси близких друг к другу стеринов, различающихся между собой точкой плавления и вращением плоскости поляризации.

Холестерол и его производные встречаются по преимуществу у животных, тогда как эргостерол и его производные содержатся в растениях, грибах, дрожжах.

Относительно наличия стеринов у бактерий вопрос остается окончательно не решенным, но более поздние работы свидетельствуют о присутствии стеринов и у бактерий (Sifferd и Anderson [7]).

Широкая распространенность стеринов в мире животных и растительных организмов позволяет рассматривать их как существенно необходимые составные части клетки. Однако физиологические функции стеринов у различных организмов остаются до сих пор не известными.

Немногочисленные работы с простейшими и дрожжами показывают, что для некоторых из них стерины являются факторами роста.

В 1938 г. Devloo [5] нашел, что прибавление от 3 до 10 γ на 1 мл среды эргостерина стимулирует рост некоторых дрожжей подобно выделенному им «биостеролу». Lwoff [6] наблюдал, что некоторые простейшие для роста в пептонной воде требуют холестерола, а Cailleao [1] установил, что кроме холестерола, фактором роста для Flagellatae являются эргостерол, ситостерол, 22-дигидро-эргостерол и ряд других стеролов.

Настоящая работа имела целью выяснить влияние эргостерола, присутствующего в питательной среде, на основные физиологические функции дрожжей — размножение и брожение.

Объектом исследования служили дрожжи Saccharomyces carlsbergensis и дрожжеподобный организм Endomyces Magnusii.

Методика

Исследуемые организмы культивировались на сусло-агаре, к которому прибавлялся кристаллический эргостерин, и на сусло-агаре без

[1] Цит. по Lwoff (6).

эргостерина. Endomyces Magnusii, кроме того, выращивался на агаровой минеральной среде Буркхольдера с эргостерином и без эргостерина.

Эргостерин прибавлялся к среде в виде кристаллов из тех соображений, что таким путем удастся избежать возможного действия растворителя эргостерина и все время поддерживать «физиологическую концентрацию» эргостерина в среде.

После прибавления эргостерина к еще горячему стерильному агару последний тщательно встряхивался и разливался в стерильные чашки Петри. При застывании агара получалась пластинка с равномерно распределившимися внутри агара кристалликами эргостерина. Такие же пластинки сусло-агара без эргостерина служили контрольной средой.

Посевной материал вносился во все чашки опыта и контроля в количестве 1 капли свежеприготовленной суспензии дрожжей или эндомицета и равномерно распределялся по поверхности чашки стеклянным шпателем.

Выросшая культура смывалась на стеклянный фильтр. После тщательного промывания отфильтрованная масса клеток отпрессовывалась между листами стерильной фильтровальной бумаги и взвешивалась. Затем часть этого материала употреблялась для определения веса сухого вещества, а часть — для испытания бродильной способности исследуемого организма в краткосрочных опытах при отсутствии размножения. Эксперименты по брожению проводились в сосудах Эйнгорна, которые в предварительных опытах были проверены в отношении совпадения объема и градуировки.

Интенсивность брожения определялась по количеству CO_2, выделенной (за определенный отрезок времени) 4% суспензией дрожжей или эндомицета в фосфатном буфере pH = 5,9 в присутствии 4% сахарозы, при 28°. Фиксация препаратов производилась формалином.

Экспериментальная часть

Влияние эргостерина на рост дрожжей и эндомицетов

Основываясь на литературных данных о значении стеринов как фактора роста для простейших в условиях сравнительно полноценной среды (пептонная вода), мы провели ряд наблюдений за развитием дрожжей Sacch. carlsbergensis и эндомицета Endomyces Magnusii, культивируя их таким образом, как указано в методической части.

Учет образовавшейся биомассы эндомицета и дрожжей показал, что присутствие эргостерина в сусло-агаре и в минеральной агаровой среде вызывало более обильный рост как того, так и другого организма, причем количественно это влияние было выражено сильнее в культуре Endomyces Magnusii.

Результаты опытов, представленные в табл. 1, показывают, что в присутствии эргостерина трехсуточная культура Sacch. carlsbergensis накапливает сухого вещества на 6% больше, чем на среде без эргостерина. У Endomyces Magnusii эта разница в среднем равна приблизительно 12%.

Возможно, что различная степень реагирования исследуемых организмов на влияние эргостерина объясняется наличием различных количеств эргостерина в самих клетках.

В то время как в культуре Sacch. carlsbergensis накапливается до 2% эргостерина (в процентах на сухое вещество), Endomyces Magnusii синтезирует его всего в количестве 0,2—0,4% (Таусон [2]). Естественно, что клетки, более богатые эргостерином, оказались менее чувствительными к влиянию дополнительных доз его, поступающих извне.

Таблица 1

Влияние эргостерина на урожай Endomyces Magnusii и Sacch. carlsbergensis

Название культуры	Продолжительность выращивания в сутках	Питательная среда	Урожай сухого вещества	
			в г	в %
Endomyces Magnusii	3	Сусло-агар (контроль)	1,021	100
		» » + эргостерин . .	1,165	114
» »	3	» » (контроль)	1,067	100
		» » + эргостерин . .	1,177	110,3
» »	3	Среда Буркхольдера (контроль)	1,252	100
		Среда Буркхольдера + эргостерин	1,417	113,1
Sacchar. carlsbergensis	3	Сусло-агар (контроль)	1,299	100
» »		» » + эргостерин . . .	1,377	106

Влияние эргостерина на морфологию и строение протопласта клеток

Микроскопические исследования препаратов культур Sacch. carlsbergensis и Endomyces Magnusii показали, что присутствие эргостерина в питательной среде вызывает заметные, качественно идентичные, как у того, так и у другого организма, изменения в морфологии и строении протопласта клетки.

В препаратах культуры Sacch. carlsbergensis, выросшей на среде с эргостерином, наблюдалось большее количество почкующихся клеток, чем в препаратах культуры, выросшей на контрольной среде. Клетки имели несколько бо́льшие размеры и более толстые преломляющие свет оболочки.

Рис. 1. Endomyces Magnusii трехсуточная культура. Окраска железным гематоксилином

В таких клетках несколько быстрее происходила прижизненная окраска клеточных структур смесью красок — зеленый янус и нейтральная красная.

В препаратах культуры Endomyces Magnusii, выросшей на среде с эргостерином, преобладали дрожжеподобные клетки, представляющие собой результаты усиленного деления гриба. Как и у Sacch. carlsbergensis, клетки имели несколько бо́льшие размеры и более толстые оболочки, чем клетки контрольной культуры.

Прижизненная окраска клеток «эргостериновой» культуры также происходила несколько быстрее, чем клеток контрольной культуры.

Хондриосомы в клетках, выросших на среде с эргостерином, иногда были настолько уплотнены, что в некоторых клетках становились видимыми без окраски.

Еще отчетливее изменения в строении протопласта клеток у «эргостериновых» культур можно было наблюдать на фиксированных и окра-

шенных железным гематоксилином препаратах. На таких препаратах клетки Endomyces Magnusii всегда имели большее число более крупных ядер и меньшее число более уплотненных, более крупных хондриосом.

Клетки Sacch. carlsbergensis, выросшие на среде с эргостерином, характеризовались наличием более крупных ядер и более крупных хондриосом.

В общем, по строению протопласта клетки, выросшие на агаровой среде с эргостерином, приближались к тем, которые Мейсель [1] относит к бродящему типу, т. е. к типу, возникающему в более восстановленных условиях, чем те, которые создаются при росте микроорганизма на поверхности агаровой среды.

Рис. 2. Saccharomyces carlsbergensis трехсуточная культура. Окраска железным гематоксилином

Указанные особенности в морфологии клетки культур, выросших на среде с эргостерином, наблюдались как в молодых, так и в более старых культурах. Рис. 1 и 2 представляют картину фиксированных и окрашенных железным гематоксилином клеток трехсуточных культур Sacch. carlsbergensis и Endomyces Magnusii.

Влияние эргостерина на брожение Saccharomyces carlsbergensis и Endomyces Magnusii

Испытание бродильной способности клеток, выросших на среде с эргостерином и без эргостерина, проводилось способом, описанным в методической части настоящей работы.

Таблица 2

Влияние эргостерина на брожение дрожжей Sacch. carlsbergensis

Условия роста культуры	Количество выделившейся CO_2					
	через 20 мин.		через 30 мин.		через 40 мин.	
	в см³	в %	в см³	в %	в см³	в %
Сусло-агар (контроль)	1,3	100	2,1	100	2,8	100
» » + эргостерин	1,6	123	2,4	114,2	3,2	114,3
» » (контроль)	1,3	100	2,2	100	2,8	100
» » + эргостерин	1,5	115,4	2,6	118,2	3,4	121,6

Результаты опытов, представленные в таблицах 2 и 3, показывают, что клетки и Sacch. carlsbergensis и Endomyces Magnusii, выросшие на среде с эргостерином, обладают большей интенсивностью брожения, чем клетки, выросшие на среде без эргостерина. При этом, как и в опытах с размножением, действие эргостерина сказывается сильнее на сбраживающей способности Endomyces Magnusii. В среднем наблюдаемое увеличение интенсивности брожения равнялось приблизительно 16—19% у Sacch. carlsbergensis и 28—31% у Endomyces Magnusii.

Таким образом, данные опытов по брожению, как и результаты исследования строения протопласта клеток, выросших на среде, содержащей эргостерин, указывают на наличие некоторого сдвига окислительно-восстановительной деятельности клеток в сторону восстановления.

Таблица 3

Влияние эргостерина на брожение Endomyces Magnusii

Условия роста культуры (до брожения)	Количество выделившейся CO_2 при брожении			
	через 1 час 30 мин.		через 3 часа	
	в $см^3$	в %	в $см^3$	в %
Сусло-агар (контроль)	1,5	100	1,8	100
» » + эргостерин	1,8	125	2,3	127
» » (контроль)	1,8	100	2,3	100
» » + эргостерин	2,3	127,7	2,9	126
» » (контроль)	1,5	100	1,9	100
» » + эргостерин	2,0	133,3	2,7	142,1

В дополнение к описанным экспериментам были произведены качественные испытания окислительной и редуцирующей способности клеток Sacch. carlsbergensis и Endomyces Magnusii, выросших в тех же условиях (т. е. на среде с эргостерином и без эргостерина).

Сравнительные определения «скоростей» окисления лейкобазы метиленовой сини и восстановления окисленной формы этой краски показали, что восстановленная метиленовая синь окисляется клетками культур, выросших на среде без эргостерина, быстрее, чем клетками, выросшими на среде с эргостерином.

Восстановление метиленовой сини клетками этих культур в фосфатном буфере в присутствии глюкозы без доступа воздуха происходило также с различной скоростью.

Суспензия клеток, выросших на среде с эргостерином, дегидрировала глюкозу значительно медленнее, чем клетки, выросшие на сусло-агаре без эргостерина. Если клетки контрольной культуры Endomyces Magnusii обесцветили раствор (т. е. восстановили метиленовую синь) в течение 120 минут, то клетки «эргостериновой» культуры произвели обесцвечивание раствора в тех же условиях через 205 минут.

Аналогичные данные были получены и в опыте с восстановлением метиленовой сини этими же культурами в присутствии янтарной кислоты. Таким образом, мы видим, что «эргостериновые» культуры значительно медленнее восстанавливают метиленовую синь, т. е. они медленнее дегидрируют глюкозу, следовательно, сдвиг окислительно-восстановительных процессов в сторону восстановления следует отнести, повидимому, за счет торможения такого звена окислительно-восстановительных систем клетки, как дегидрогеназа.

Заключение

Полученные в настоящей работе результаты указывают на несомненное участие эргостерина в жизнедеятельности клеток Sacch. carlsbergensis и Endomyces Magnusii.

Имеющиеся в литературе, хотя еще не многочисленные, экспериментальные данные говорят о том, что стерины, входя в состав некоторых клеточных структур (Bensley [3]), могут принимать участие в окислительно-восстановительных процессах, протекающих в клетке.

Как составная часть клеточных мембран и оболочек, они могут регулировать явления проницаемости некоторых веществ в клетку (Boas [4]).

Не исключена возможность, что в экспериментах, описанных в настоящей работе, эргостерин выступает в качестве регулятора окислительно-восстановительных процессов, протекающих внутри клетки, сдвигая их в сторону восстановления. Результатом этого может являться не

только усиление сбраживающей способности, но и некоторое стимулирование роста и размножения изучаемых организмов.

Хотя процесс размножения и коррелирует в общем с процессами окисления, но известно, что чрезмерное преобладание окислительных реакций и избыток кислорода приводят к противоположным результатам.

Сдвиг реакций в сторону восстановления, который вызывается эргостерином, повидимому, создает такое соотношение между деятельностью окислительных и редуцирующих систем клетки, при котором происходит несколько большее преобладание процессов синтеза над процессами диссимиляции, результатом чего является и несколько больший прирост биомассы изучаемых микроорганизмов.

Только дальнейшие, более подробные исследования действия стеринов на различные микроорганизмы позволят подойти к выяснению вопроса о механизме действия стеринов и значения их в жизнедеятельности микроорганизмов.

Выводы

1. В результате исследования влияния эргостерина на размножение и бродильную способность дрожжей Saccharomyces carlsbergensis и дрожжеподобного организма Endomyces Magnusii установлено, что прибавление эргостерина к агаровой питательной среде вызывает увеличение прироста биомассы Sacch. carlsbergensis в среднем на 6%, а у Endomyces Magnusii — на 12%.

2. Интенсивность брожения клеток, выросших на среде с эргостерином, в условиях «острого опыта» превышает интенсивность брожения клеток, выросших на среде без эргостерина, у Sacch. carlsbergensis в среднем на 16—19%, а у Endomyces Magnusii — на 30—31%.

3. Эргостерин, присутствующий в среде во время роста клеток, вызывает заметную перестройку их протопласта, выражающуюся в увеличении массы ядра и хондриосом.

4. Клетки, выросшие на среде с эргостерином, дегидрируют глюкозу и янтарную кислоту медленнее, чем клетки, выросшие на среде без эргостерина.

5. Полученные результаты позволяют заключить, что эргостерин, присутствующий в среде во время роста клеток, сдвигает окислительно-восстановительные процессы, протекающие внутри клетки, в сторону восстановления, возможно, за счет торможения активности такого звена окислительно-восстановительной системы клетки, как дегидрогеназа.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 29.VIII.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Мейсель М. Н. Перестройка протопласта дрожжевых организмов в процессе брожения. Микробиология, т. VIII, вып. 3—4, 1939.
2. Таусон Т. А. Распространение и условия накопления эргостерина (провитамина D_2) в дрожжевых организмах. Микробиология, т. XI, вып. 1—2, 1942.
3. Bensley R. On the fat distribution in the mitochondria in the guinea pig liver. Anat. Rec., v. 69, p. 341, 1938.
4. Boas F. Die Wirkung der Saponinsubstanzen auf die Hefezelle. Ber. Dtsch. Bot. Ges., Bd. 40, S. 32, 1922.
5. Devloo R. Un stérol indispensable à la levure W. Arch. Intern. Physiol., v. XLVI, 157, 1938.
6. Lwoff A. Les facteurs de croissance pour les microorganismes. Ann. Inst. Pasteur, v. 61, 580, 1938.
7. Sifferd R. and Anderson R. Über das Vorkommen von Sterinen in Bakterien. Z. phys. Chem., Bd. 239, S. 270, 1936.

АНТАГОНИЗМ МЕЖДУ ПЛЕСНЕВЫМИ ГРИБАМИ

А. Г. Романкова

В прошлом недостаточно оценивалась возможность заражения культуры Aspergillus niger посторонней микрофлорой. Waksman [12] по этому вопросу пишет: «...некоторые микроорганизмы способны расти в практически чистых культурах в нестерильных условиях, это относится к образованию лимонной кислоты грибом Aspergillus niger». С подобным заключением автора нельзя согласиться.

При детальном микробиологическом изучении процессов роста и кислотообразования Asp. niger в нестерильных условиях был обнаружен ряд микроорганизмов: бактерии, дрожжи, несовершенные грибы, плесени.

Это не были безразличные для культуры Asp. niger спутники. Определенные виды их активно влияли на гриб. Ввиду отсутствия литературных данных по этому вопросу мы можем сообщить лишь о своих наблюдениях. Они сведены в трех последовательно проведенных работах[1]: 1) Антагонизм между Asp. niger и другими грибами, 2) Антагонизм между Asp. niger и дрожжевыми организмами, 3) Антагонизм между Asp. niger и бактериями. В настоящей статье мы касаемся исключительно первого вопроса.

Однако, прежде чем перейти к изложению экспериментального материала, остановимся на общих положениях по антагонизму плесневых грибов.

Антагонизм между плесневыми грибами впервые был отмечен De Bary [3] в 1879 г. Значительно ранее Raulin [7] показал стимулирующее влияние грибов в смешанных культурах.

На большом экспериментальном материале Porter [6], Zeller и Smitz [11] и другие установили, что взаимные влияния грибов в смешанных культурах могут быть от едва заметных до крайне глубоких. Основные типы их представляются следующим образом:

1. Взаимная слабая задержка →←
2. Взаимное препятствие → ←
3. Рост вокруг сопротивляющегося организма
4. Рост гриба на поверхности другого
5. Стимуляция роста
6. Отсутствие влияния ↑↑

Причина наблюдаемого антагонизма плесневых грибов связывается Kruse [5] и другими 1) с различной скоростью развития мицелия, 2) с изменением кислотности среды, 3) с недостатком питательных веществ и, наконец, 4) с продуктами обмена грибов.

В особой группе стоят плесневые грибы, проявляющие себя как паразиты других плесеней.

В связи с нашими исследованиями мы рассмотрим эту группу несколько подробнее. Среди грибов-паразитов, как об этом пишет Курсанов [1], могут быть обнаружены все обычные типы паразитизма: 1) внутриклетный, 2) межклетный, но с гаусториями, проникающими внутрь клеток гриба-хозяина, и 3) исключительно межклетный.

---

[1] А. Г. Романкова. Влияние посторонней микрофлоры на кислотообразование Aspergillus niger. Канд. диссертация. Лен. Гос. ун-т. Рукопись. 1938.

Известны случаи паразитизма видов Aspergillus, Penicillium на Mucor (Reinhardt [8]). Паразитический характер воздействия Pen. rugulosum на Asp. niger отмечен Thom и Church [9] и нашими исследованиями [2]. Любопытен факт проявления паразитизма у близко родственных форм. Так, Mortierella, Piptocephalis (сем. Mucoraceae) паразитируют на мукоровых [1]. При этом гифы паразита плотно прикладываются к телу гриба-хозяина и пускают внутрь тонкие гаустории. У Parasitella и Chaetocladium (сем. Mucoraceae) этот процесс протекает следующим образом: гифы паразита возбуждают к изменению направления роста гиф гриба-хозяина в свою сторону. В момент соприкосновения кончик гифы паразита плотно приклеивается к одному из разветвлений гиф гриба-хозяина и отделяется перегородкой. При этом образуется самостоятельная, так называемая «насасывающая клетка». Вскоре стенки ее растворяются, а протоплазма и ядро гиф гриба-хозяина проникают в насасывающую клетку. Накапливаемый здесь запас питательных веществ используется гифами паразита.

Несмотря на большое количество примеров паразитизма плесневых грибов, подробно описываемых исследователями со стороны морфологических изменений, установление антагонистического начала образуемого паразитизма в каждом отдельном случае представляется весьма сложной проблемой. Однако общие положения в этом вопросе достаточно ясны.

Приводим обобщающие выводы, сделанные Курсановым [1]. Паразиты должны обладать: 1) ферментами, воздействующими на клеточные стенки гриба-хозяина, 2) токсинами, которые способствуют устойчивости паразита к воздействию живых клеток гриба-хозяина, и 3) должны приспособляться к условиям развития при некотором недостатке кислорода.

Экспериментальная часть

Целью нашего исследования являлось: 1) установить видовой состав плесневых грибов, сопутствующих Aspergillus niger раздельно при процессе его роста и кислотообразовании; 2) изучить влияние найденных плесневых грибов на изменение активности кислотообразования культуры Aspergillus; 3) установить основной тип взаимоотношений между Aspergillus niger и грибами-спутниками; 4) использовать полученные данные для изучения условий, по возможности исключающих влияние антагонистов.

Примененный метод выделения и определения грибов Penicillium и Aspergillus

Произведенные нами микробиологические посевы Asp. niger в нестерильных условиях позволили установить, что заражающими формами преимущественно являются виды Aspergillus и Penicillium.

Для выделения культур, помимо сусло-агара, мы применили среду Ролэна — Костычева, на которой культивируется Asp. niger при бессменных культурах, добавив в нее вытяжку из пленки Aspergillus и небольшие количества лимонной кислоты (0,5%). Состав этой среды: NH_4NO_3 — 0,3 г, KH_2PO_4 — 0,1 г, $MgSO_4$ — 0,1 г, $ZnSO_4$ — 0,01 г, $FeSO_4$ — следы, сахароза — 20 г, агар-агар — 1,5 г на 100 мл воды.

Для изучения культуральных признаков служили сусло-агар, сусло-желатина, МПА с 3% глицерина, рис, белый хлеб, а также синтетические среды. Для грибов Aspergillus применялся агар Чапека, для видов Penicillium, кроме того,— агар Бьюрж и Ролэна (сахароза — 46 г, NH_4NO_3 — 2,6 г, $NH_4H_2PO_4$ — 0,4 г, K_2CO_3 — 0,4 г, $MgCO_3$ — 0,4 г, $(NH_4)_2SO_4$ — 0,16 г, $ZnSO_4$ — 0,04 г, $FeSO_4$ — следы, вода — 1 000 мл).

При определении видов грибов мы пользовались монографиями по Penicillium Thom [10] и по Aspergillus — Thom и Church [9]. Для уточнения окраски спор культур и выделяемого ими пигмента мы обращались к кодексу цветов Klincksieck и Valette [4].

В табл. 1 помещена лишь небольшая часть признаков, которые нами были изучены прежде, чем мы решились дать видовое название нашим культурам.

Таблица 1

Характеристика культур грибов Aspergillus на агаре Чапека

Культура	Размер колонии на 10-й день, в мм	Скорость спорообразования в днях	Окраска по кодексу цветов		Рост при разных температурах		
			спор	культуральной жидкости	22°	32°	46°
Asp. fumigatus Fresenius	7—10	2	393 серо-зеленая	151 от желтой до оранжевой	+	+++	+++
Asp. flavus Link	15—20	3	252 259 светло-зеленая	151	+	+++	—
Asp. sulfureus Thom	20	2—3	153Д —162 сернисто-желтая	зеленовато-коричневая	+	+++	—
Asp. penicilloides Spigazinii	10—12	2	353 голубовато-зеленая	113	+	+++	—
Asp. terreus Thom	15—20	3—4 вскоре покрывается воздушным мицелием	109 113	113	+	+++	—

Таблица 2

Микроскопические измерения культур Aspergillus

(агар Чапека на 5-й день роста)

Культура	Конидиеносец в μ	Головка в μ	Визикула		Стеригмы в μ	Конидии	
			размер в μ	форма		размер в μ	форма
Asp. fumigatus	140×138× ×5,7—6	17—31	11,6—19	Булавовидная	5,7—8,5× ×2,8—3,0	2,8—3,1	Круглая
Asp. flavus	550—670× ×8,5—10	74—84	11,4—31,4	Шаровидная	11,4×3,3—5,7	3,5—5,7 редко 7	»
Asp. sulfureus	140—180× ×5—6,4	75,6× ×19—25	10—15	Булавовидная	1-й ярус 7—12,8× ×2,85—3,1 2-й ярус 5,6×1,7	2—2,8	»
Asp. penicilloides	100—185	4,3—5,7	8—13,5	Сильно вытянутая		2,8—3	»
Asp. terreus	70—230× ×4,3—8,5	30—40	10—17	Грушевидная	1-й ярус 5,7×8,5 2-й ярус 2×3,0	2,8—3	От круглой до эллиптической

Приводим список найденных нами грибов: Asp. flavus, Asp. fumigatus, Asp. sulfureus, Asp. terreus, Asp. penicilloides, Penicillium rugulosum, Pen. silvaticum.

В связи с тем, что некоторые из перечисленных грибов упоминаются в литературе как источники антибиотических препаратов (фумигацин из Asp. fumigatus и др.), полезно привести полученные нами материалы, позволяющие здесь познакомиться с признаками этих грибов (таблицы 1 и 2).

Основанием для определения наших культур служили также их микроскопические признаки.

В такой же краткой характеристике нуждаются найденные нами виды Penicillium (таблицы 3 и 4). Попутно следует отметить, что определение грибов Penicillium обычно настолько затрудняет исследователей, что они ограничиваются родовым названием Penicillium или чаще именуют свои виды как Penicillium glaucum. Такое положение не может удовлетворять микологов, и следует пытаться внести ясность в существующие методы определения такой широко распространенной группы грибов. Эти вопросы явились темой других наших работ.

Таблица 3

Характеристика культур Penicillium на нейтральном агаре Бьюрж — Ролэна

Культура	Размер колонии на 6-й день в мм	Окраска по кодексу цветов		Скорость спорообразования в днях	Развитие при разных температурах			
		спор	пигмента		22°	32°	36°	46°
Pen. rugulosum	10—12	390 темно-зеленая	37 вишнево-красная	4—6	+	+++	+++	±
Pen. silvaticum	5—6	368 серо-зеленая	—	4	+++	+	±	—

Таблица 4

Микроскопические измерения частей Penicillium на агаре Чапека

(6-дневная культура)

Культура	Конидиеносцы в μ	Количество вертицилл	Кисти в μ	Метулы в μ	Стеригмы в μ	Конидии	
						размер в μ	форма
Pen. rugulosum	9,4×2,8	2	24—45 (при развитии 2-й вертициллы)	10,7×2,85	11,4×2,85×	3,3×2,85	Эллиптическая
Pen. silvaticum	Длинные	2	25	11,4—17× ×5,4	10—12,8× ×3,0	5,2—5,7	Круглая

Заканчивая с разрешением первого вопроса — определением видового состава сопутствующих Asp. niger плесневых грибов, переходим к накоплению фактов, объясняющих появление этих грибов в процессе роста и кислотообразования Asp. niger.

Данные таблиц 1 и 3 показывают, что наши чистые культуры Aspergillus и Penicillium (исключая Pen. silvaticum, который значительно реже встречается) хорошо развиваются при 32° и даже более высокой (для Asp. fumigatus — 46°). Температура 32° соответствует условиям роста и кислотообразования Asp. niger.

Далее важно было найти объяснение следующему: из всего списка грибов только Penicillium rugulosum до конца процесса кислотообразования сопутствует Asp. niger, остальные формы плесеней обнаруживаются лишь в период развития грибной пленки Aspergillus.

Для выяснения этого вопроса были поставлены опыты на синтетической среде для роста Asp. niger (см. методику) с различным содержанием лимонной кислоты. Эти опыты показали различное отношение изучаемых грибов к лимонной кислоте, с которой они неизбежно встречаются в смешанной культуре с Asp. niger (табл. 5).

Таблица 5

Рост грибов при различных концентрациях лимонной кислоты

Культура	Концентрация лимонной кислоты в %							
	0,5	1	2	3	6	8	15	20
Asp. fumigatus	+	+	—	—	—	—	—	—
» flavus	+	+	—	—	—	—	—	—
» terreus	+	+	—	—	—	—	—	—
» sulfureus	+	+	—	—	—	—	—	—
» penicilloides	+	+	—	—	—	—	—	—
Pen. rugulosum	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
» silvaticum	+	—	—	—	—	—	—	—

Таким образом, Penicillium rugulosum характеризуется исключительной ацидофильностью — он способен развиваться в растворах при содержании 15% лимонной кислоты, которая при концентрации свыше 1% уже подавляет развитие других плесеней.

Дальнейшие исследования, выясняющие влияние посторонних грибов на процесс кислотообразования Asp. niger, показали следующее (табл. 6).

Таблица 6

Кислотообразование Asp. niger в смешанных культурах с плесневыми грибами на среде Ролэна — Костычева

Культуры	Соотношение спор Asp. niger и посторонних грибов	Лимонная кислота на колбу, в г	Воздушно-сухой вес пленок гриба в г	Остаток сахара в культуральной жидкости (из 20,3 г) в конце опыта на колбу, в г
Asp. niger (контроль)		11,5	3,2	2,9
» » + Pen. rugulosum	1/1	0,4	1,2	10,5
» » + » silvaticum	1/1	11,1	3,5	3,2
» » + Asp. flavus	1/1	11,3	3,3	2,9
» » + » sulfureus	1/1	11,6	3,4	3,0
» » + » terreus	1/1	11,0	3,2	3,2
» » + » penicilloides	1/1	11,5	3,1	3,1
» » + » fumigatus	1/1	11,1	3,5	2,8

Опыты с очевидностью показывают, что Asp. niger находится в состоянии активной борьбы с большинством заражающих его плесеней. Даже при равном соотношении спор (1 : 1), как это было в опытах,

Asp. niger с легкостью подавляет их развитие. Присутствие этих плесеней ни в какой степени не влияет ни на активность кислотообразования Asp. niger, ни на общее потребление сахара грибом, ни на накопление им сухого веса мицелия.

Иначе обстоит при заражении Asp. niger спорами Penicillium rugulosum. Это наиболее опасный противник Aspergillus, и на его изучении мы остановимся.

Изменения активности кислотообразования Asp. niger в связи с различным содержанием в смешанных культурах спор Pen. rugulosum и Asp. niger представлены на рис. 1, из которого следует, что если на 5 000 спор Asp. niger попадает только одна спора Pen. rugulosum, то можно наблюдать значительные потери лимонной кислоты.

Переходя к вопросу о взаимоотношении между Asp. niger и Penicillium rugulosum, мы должны были выяснить, связано ли наблюдаемое угнетение Aspergillus в смешанной культуре с Penicillium с недостатком питательных веществ в среде или значительное большее влияние здесь оказывают продукты обмена Pen. rugulosum.

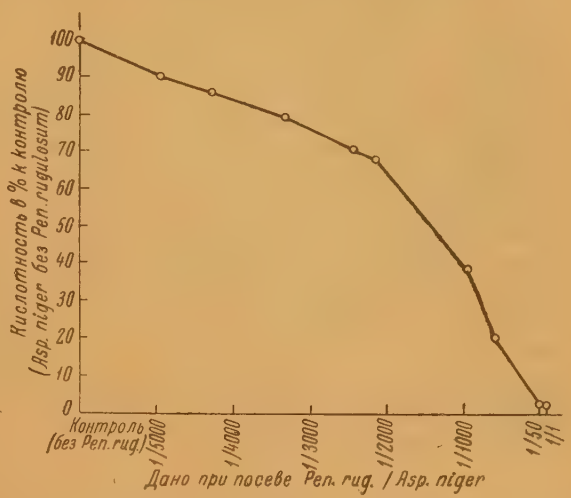

Рис. 1. Падение кислотности Aspergillus niger при заражении Penicillium rugulosum

Следовало также выяснить, может ли готовая пленка Asp. niger, лишенная питательного раствора, служить источником питания для пенициллa-антагониста и какова при этом анатомическая картина совместного роста Asp. niger и Pen. rugulosum. Для суждения по первому вопросу весьма существенно было выяснить способность чистой культуры P. rugulosum усваивать сахар, азот, а также лимонную кислоту в условиях питательной среды Ролэна — Костычева, употребляемой для культуры Asp. niger.

В этих опытах одна серия колб содержала по 100 мл этой смеси, в другую, кроме того, было добавлено 6% лимонной кислоты. На этих средах выращивались пленки чистой культуры Pen. rugulosum при температуре 32°.

Через 5, 7, 9, 12 суток роста парные колбы с грибом снимались для количественного определения в культуральной жидкости остаточного сахара (по Бертрану), общего азота (по Кьельдалю) и лимонной кислоты (методом Буткевича) в тех колбах, где кислота добавлялась в начале опыта.

Результаты представлены в табл. 7.

Как показали опыты, Pen. rugulosum характеризуется весьма слабой энергией потребления сахара и азота по сравнению, например, с Asp. niger, при этом и лимонная кислота в условиях опыта оставалась почти без изменения. Следовательно, понижение активности кислотообразования Aspergillus при воздействии Pen. rugulosum нельзя объяснить потреблением этим грибом лимонной кислоты, а также недостатком питательных веществ в среде для культуры Asp. niger.

Таблица 7

Потребление сахара, азота и лимонной кислоты культурой Pen. rugulosum

Возраст гриба в днях	Среда без лимонной кислоты			Среда с лимонной кислотой		
	Остаток сахара по анализу из 21,6 г, в г	Потреблено сахара, в г	Остаток азота из 105 мг, в мг	Остаток сахара по анализу из 21,6 г, в г	Потреблено сахара, в г	Остаток лимонной кислоты из 6,3 г, в г,
5	16,9	3,7	68,3	18,6	3,0	6,28
7	12,2	9,4	—	17,4	4,2	6,25
9	10,7	10,9	—	16,5	5,1	6,27
12	7,8	13,8	—	14,6	7,0	6,26

В этих опытах наибольший интерес представляют данные, относящиеся к 5-суточному возрасту пленок Penicillium, так как это максимальный срок пребывания культуры Asp. niger на одной и той же бессменной питательной среде.

По нашим наблюдениям, одной из причин нарушения кислотообразования Aspergillus являются вещества, выделяемые Pen. rugulosum в культуральную жидкость. Согласно полученным данным (табл. 8), добавление этих веществ к питательной смеси для роста Asp. niger в количестве 6 мл на 100 мл среды снижает кислотность, образуемую Aspergillus, почти на 40%. Вещества, тормозящие кислотообразование, не разрушаются при 120° в автоклаве и фильтруются через фильтр Шамберлена.

Таблица 8

Опыты с фильтрацией культуры

Культура Asp. niger	Лимонная кислота в г/колбу	Среднее количество лимонной кислоты от контроля в %	Воздушно-сухой вес пленки Asp. niger в г
Среда без добавления фильтрата (контроль) . .	10,8 11,0	100	3,40 3,53
С добавлением фильтрата 7-дневной культуры Pen. rugulosum (фильтрование через свечу Шамберлена)	6,3 6,6	62	3,60 3,58
С добавлением культуральной жидкости Pen. rugulosum, убитой нагреванием до 120° . . .	7,1 6,9	64	3,55 3,46
С добавлением живых клеток Pen. rugulosum .	0,3 0,2	2,2	1,20 1,40

Таким образом, продукты обмена Pen. rugulosum, угнетая активность кислотообразования Asp. niger, не препятствуют накоплению воздушно-сухого веса мицелия Aspergillus. Как это вытекает из приведенных данных, наблюдаемые изменения в накоплении сухого веса грибными пленками касаются лишь варианта опыта со смешанной культурой Asp. niger и Pen. rugulosum. Здесь сухой вес пленок Aspergillus достигал едва 45% от веса контрольных.

Это явление сопровождалось разрушением мицелия Asp. niger.

Виновниками наблюдаемого разрушения гриба являлись живые колонии Pen. rugulosum. Его колонии, единичные вначале, быстро распространялись по всей поверхности Aspergillus, скрывая его под своим

покровом. Мицелий Asp. niger при этом превращался в бесструктурную слизистую массу.

Для окончательного заключения о типе взаимоотношений между Asp. niger и Pen. rugulosum мы считали необходимым выяснить возможность использования Penicillium пленки Asp. niger, предоставленной грибу в качестве единственного источника питания. При постановке опытов мы пользовались четырехдневными пленками Asp. niger, выращенными с этой целью на среде Ролэна — Костычева. Тщательно отмытые от питательных солей готовые пленки Asp. niger помещались затем в колбы с 100 мл дестиллированной воды и затем поверхность их заражалась спорами Pen. rugulosum. Контролем в этих опытах служили пленки Aspergillus, также на дестиллированной воде, но без внесения спор Pen. rugulosum. Часть опытных пленок была оставлена для определения первоначального сухого веса мицелия Aspergillus.

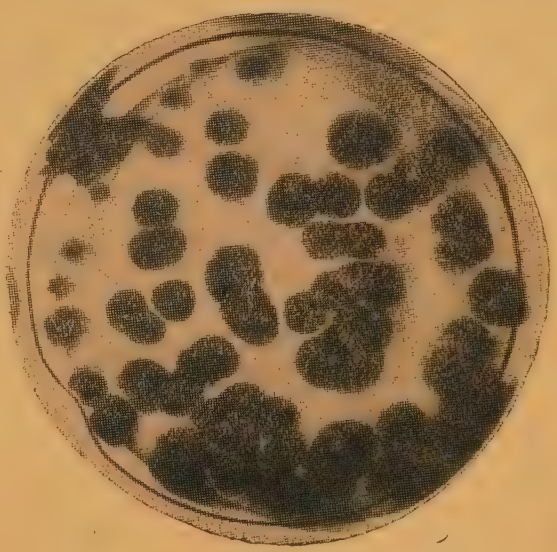

Рис. 2. Колонии Penicillium rugulosum на агаре Чапека

Наблюдения производились в продолжение 5 суток (табл. 9).

Проведенные опыты с очевидностью доказывают паразитическую природу взаимоотношений Pen. rugulosum с Aspergillus niger. Первый с успехом использует для своего развития питательные вещества, содержащиеся в пленке Aspergillus. При этом интересно было установить, распространяется ли паразитическое воздействие Pen. rugulosum только на Asp. niger или не исключается возможность угнетения и других видов плесневых грибов. Основанием для ответа служили следующие данные (табл. 10).

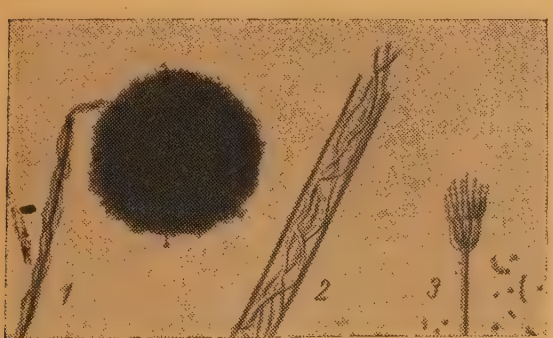

Рис. 3. Aspergillus niger, зараженный Penicillium rugulosum. *1* — из головки и конидиеносца Aspergillus niger выступают кисточки Penicillium rugulosum. *2* — гифы Penicillium rugulosum внутри конидиеносца Aspergillus niger. *3* — кисть Penicillium rugulosum

Наши исследования мы закончили анатомическими срезами пленки Asp. niger, зараженной Penicillium; микроскопическое изучение их показало, что гифы Pen. rugulosum проникают внутрь гиф Aspergillus (рис. 2 и 3).

Изучение ферментной системы гриба паразита является следующей частью работы.

Таблица 9

Изменение воздушно-сухого веса готовых пленок, предоставленных Pen. rugulosum в качестве единственного источника питания

Первоначальный воздушно-сухой вес пленок в г	Воздушно-сухой вес после 5 суток опыта в г		Убыль веса пленок от первоначального веса в %	
	контроль	пленки, зараженные Pen. rugulosum	контроль	пленки, зараженные Pen. rugulosum
3,5	3,24	1,48	7,4	60,0
3,7	3,40	1,52	8,1	56,2

Таблица 10

Взаимоотношение Pen. rugulosum с другими видами грибов

Культура	Воздушно-сухой вес пленок после 5 суток роста грибов на среде Ролана—Костычева в г		Воздушно-сухой вес пленки от контроля в %
	чистая культура (контроль)	зараженная Pen. rugulosum	
Asp. flavus	1,65	0,45	42
» terreus	1,52	0,82	53
» penicilloides	1,2	0,58	40
» silvaticum	2,00	1,28	60

Установив основной характер взаимоотношений Asp. niger и Pen. rugulosum, мы провели исследования для 1) подыскания антисептика для борьбы с грибом-паразитом и 2) подбора культур Asp. niger, более активно сопротивляющихся воздействию паразита. Это дало вполне определенные результаты, о которых будет сообщено позднее.

Выводы

1. Плесневые грибы, сопутствующие росту и кислотообразованию Asp. niger в нестерильных условиях, представлены видами Penicillium и Aspergillus. Антагонистом Asp. niger является Pen. rugulosum, способный развиваться при 15% содержании лимонной кислоты в растворе.

2. Причина падения кислотности, образуемой культурой Asp. niger, не связана с потреблением лимонной кислоты грибом Pen. rugulosum, но с продуктами его обмена и главным образом с проявлением хорошо выраженного паразитизма, что подтвердилось анатомическими срезами и опытами культивирования паразита на грибных пленках Asp. niger в отсутствие каких бы то ни было других источников питания.

3. Антагонизм Pen. rugulosum распространяется на многие другие виды Penicillium и Aspergillus, что необходимо учесть в связи с процессами получения антибиотических препаратов.

Научно-исследовательская лаборатория
завода лимонной кислоты
Ленинград

Получено 7.VIII. 1946

ЛИТЕРАТУРА

1. Курсанов Л. И. Микология, 1933.
2. Романкова А. Г. О паразитизме плесени Penicillium rugulosum на Aspergillus niger, ДАН, т. III, 1936.
3. De Bary A. Die Erscheinungen der Simbios. Strasburg, 1879.
4. Klincksieck K. P. et Valette T. Code de couleurs. Paris, 1908.
5. Kruse W. Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig, S. 161, 1910.
6. Porter C. L. Concerning the characters of certain fungi as exhibited by their growth in the presence of other fungi. Am. J. Bot., v. II, p. 160, 1924; Proc. Ind. Acad. Sci., v. 41, 1932.
7. Raulin J. Études chimiques sur la végétation. Ann. Sci. Nat. Bot., v. (5) 11, p. 93, 1869.
8. Reinhardt M. O. Das Wachstum der Pilzhyphen. Jahrb. Wiss. Bot., Bd. 23, 1903.
9. Thom C. and Church M. The Aspergilli. London, 1926.
10. Thom C. The Penicillia. London, 1930.
11. Zeller S. M. and Smitz H. Studies in the physiology of the fungi VIII. Mixed cultures. Ann. Mis. Bot. Gard., v. 6, p. 183, 1919.
12. Waksman S. Associative and antagonistic effect of microorganism, Soil Sci., v. 43, p. 53, 1937.

ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТОВ ТОКСИЧЕСКИХ ГРИБОВ НА ЖИВОТНЫЕ И РАСТИТЕЛЬНЫЕ ТКАНИ

В. И. Билай

Советскими учеными установлен за последнее десятилетие ряд новых токсических видов грибов, поражающих кормовые и пищевые продукты во время их хранения и оказывающих остро токсическое действие на организм животных и человека. Такими, по имеющимся литературным данным, можно считать 4 вида плесневых грибов, обладающих резко выраженным токсическим действием на организм животных и человека, а именно — Stachybotrys alternans Bonord., Dendrodochium toxicum Pidopl. et Bilai, Fusarium poae (Peck) Wr., Fusarium sporotrichoides Sherb. [1, 2, 3, 4].

Как установлено Пидопличка и Билай [2], развитие токсических грибов на зерне хлебных злаков находится в тесной зависимости с понижением всхожести зерна.

Известно, что в явлениях отравления клеток, особенно связанных с их отмиранием, кроме наличия специфических реакций различных тканей, органов и организмов, существует целый ряд общих признаков для животной и растительной клетки.

На основе механизма и характера действия ядов на живую клетку в значительной степени и построена их современная классификация: различают общеплазматические яды, вызывающие смерть как растительных, так и животных клеток, и органотропные, оказывающие токсическое действие на определенные органы и ткани.

Целью наших исследований было установить действие на растительные ткани ядов грибов, токсических для человека и животных. В предлагаемой работе нами изучалось:

1) действие различных экстрактов токсических грибов на декапиллированную кожу кролика;

2) действие ацетоновых экстрактов на а) листовую, стеблевую ткань ростков различных растений и б) на листовую ткань различных вегетирующих растений.

1. Действие различных экстрактов токсических грибов на декапиллированную кожу кролика

С этой целью испытывалась токсичность водных, спиртовых, ацетоновых и эфирных экстрактов вышеназванных грибов, а также и некоторых других грибов, изучавшихся ранее и обладавших менее резким токсическим действием на организмы животных.

Методика приготовления экстрактов состояла в следующем: стерильное увлажненное зерно (просо) заражалось чистыми культурами испытуемых видов грибов. По истечении 15-дневного срока такое зараженное просо стерилизовалось, измельчалось в порошок и навески его по 10 г заливались в колбочках соответственно горячей дестиллированной водой, ацетоном, спиртом и эфиром и герметически закупоривались. Спустя 2—3 дня содержимое отфильтровывалось от зерна, ацетон, эфир и спирт испарялись в термостате при 50—55° в вытяжном шкафу, а водные фильтраты упаривались в водяной бане до получения кашицы равного объема с остатком масла в ацетоновом экстракте. Затем стеклянной палочкой диаметром в 4 мм с оплавленным концом наносилась капля экстракта на декапиллированную кожу кролика. В качестве контроля испытывалось масло из стерильного, не зараженного грибами проса, а также

Таблица 1

Сравнительное действие различных экстрактов токсических грибов на кожу кролика

Наименование экстракта	Время наблюдения			
	через 24 часа	через 48 часов	на 3-и сутки	на 10-е сутки
		Dendrodochium toxicum		
Водный	Покраснение и утолщение кожи	Сильное утолщение кожи и подкожных тканей. Разлитой некроз	Некроз разлитой и кровоизлияния	Кровоточащие трещины, слабо заживающие
Спиртовый	Покраснение с точечными кровоизлияниями	Сильное утолщение кожи. Разлитой некроз с побелевшим краем	То же	Заживление значительно слабее
Ацетоновый	То же	Более разлитой некроз ткани по сравнению с предыдущим	Развитие некроза значительнее	То же
		Stachybotrys alternans		
Водный	Покраснение	Покраснение и утолщение кожи и подкожной ткани	Слаборазлитой некроз и покраснение вокруг него	Заживающие некротические язвы
Спиртовый	»	То же	Сильноразлитой некроз с кровоизлиянием из трещин	То же
Ацетоновый	»	» »	То же	» »
		Fusarium poae и *F. sporotrichoides*		
Водный	Покраснение	Утолщение кожи и покраснение	Слаборазлитой некроз и покраснение вокруг	Заживающие некротические язвы
Спиртовый	»	То же	Сильное покраснение и некроз; утолщение кожи	То же
Ацетоновый	»	» »	Сильноразлитой некроз и кровоточащие трещины ткани	» »

ацетон, эфир и спирт. Наблюдения над характером действия экстрактов на декапиллированную кожу кролика производились через 24, 48 часов, на 3-ьи и 10-е сутки.

В табл. 1 приводятся данные о действии различных экстрактов испытуемых грибов на кожу кролика.

Водные экстракты остальных испытываемых нами токсических грибов не оказывали токсического действия на кожу кролика. Ацетоновые и эфирные экстракты из культур Mucor hiemalis, Mortierella polycephala, Trichoderma lignorum вызывали гиперемию и незначительный некроз; эфирные экстракты из культур Fusarium poae, F. sporotrichoides, Stachybotrys alternans, Dendrodochium toxicum оказывали действие, аналогичное ацетоновым.

Таким образом, как видно из приведенной таблицы, наиболее токсичными экстрактами из испытанных нами оказались ацетоновые и эфирные экстракты и из них наиболее токсическое действие на кожу кролика (разлитой некроз и долгое незаживание язв, ран) оказывали экстракты Dendrodochium toxicum. Вследствие этого в дальнейших исследованиях токсического действия на растительные ткани мы пользовались лишь ацетоновыми экстрактами.

2. Токсическое действие ацетоновых экстрактов Dendrodochium toxicum, Fusarium poae, Stachybotrys alternans на листовую и стеблевую ткань ростков

Действие экстрактов испытывалось на 3—5 ростках фасоли, подсолнуха, выращенных в стерильном песке в чашках Коха. Ацетоновые экстракты изучаемых грибов наносились стеклянной палочкой с одной стороны основания стебля, занимающей около $^1/_3$ окружности его и до 1—2 см в длину, на листе же — по центральной жилке у фасоли и подсолнуха и в верхней части листа овса. В качестве контроля в таких же дозировках наносился ацетоновый экстракт из проса, не зараженного грибами, и ацетон. Через 48 часов на листьях ростков фасоли, подсолнечника, овса, в местах нанесения экстракта, образовывались четко заметные обесцвеченные пятна пораженной ткани, затем наблюдалось скручивание листа, а впоследствии — засыхание пораженной ткани и некоторое отставание в развитии всего растения в сравнении с контрольными. На стеблях также образовывались резко очерченные буроватые, углубленные пятна, долго не заживающие и напоминающие ожоги. Исследование срезов пораженной ткани показало, что яд грибов, проникая через покровную ткань, вызывает отмирание клеток эпидермиса и паренхимы (некроз); в препарате видны клетки со сплющенной оболочкой и буроватыми включениями. Места ожогов экстрактами Stachybotrys alternans, Fusarium poae в большинстве случаев более резко, чем ожоги экстрактами Dendrodochium toxicum, очерчены выпуклой буроватой каймой, очевидно, опробковевших клеток.

Как было нами впоследствии выяснено, характер ожога определяется не только различными свойствами ядовитых веществ отдельных видов испытуемых грибов, но также и реакцией различных видов растений.

Кроме изучения действия экстрактов токсических грибов на листовую и стеблевую ткань ростков различных растений, мы испытали их действие на старые клубни картофеля, корни моркови, плоды огурца и зеленые плоды помидора. Во всех случаях было установлено, что токсическое вещество испытуемых видов грибов, находящееся в ацетоновых экстрактах, проникая через покровные ткани, вызывает побурение ткани, напоминающее ожоги, некроз клеток, наступающий не одинаково быстро. Так, при нанесении капли экстракта на неочищенный клубень картофеля только через 10—15 дней можно было обнаружить побуре-

ние ткани в местах нанесения, сморщенность кожуры и дряблость ткани под кожурой; на срезах под микроскопом видны были сплющенные деформированные клетки пораженной ткани. При нанесении экстрактов на зеленый плод помидора нами было отмечено, что покраснение полосок в местах нанесения экстракта не наступало совсем или наступало при его вызревании значительно позднее, чем на остальных участках плода помидора. Это наблюдение также говорит о том, что яды грибов, проникая в клетку, вызывают нарушение процессов пигментообразования, происходящих при созревании плодов помидора.

3. Испытание токсического действия экстрактов токсических грибов на листовую ткань различных растений

Согласно результатам многочисленных исследований, первыми признаками ожогов на листьях при опрыскивании парижской зеленью или другими препаратами является образование коричневых пятен, вследствие отмирания клеток эпидермиса, паренхимы и усиленного образования пробковой ткани; впоследствии места таких ожогов подсыхают и начинают выпадать. Чувствительность различных растений к ядам зависит вообще от степени развития и проницаемости кутикулы и эпидермиса и специфической чувствительности протоплазмы. По степени чувствительности к действию различных ядов растения нередко отличаются даже в пределах вида (сортовая устойчивость). Согласно литературным данным, мышьяковистые соединения дают ожоги с неясным контуром, постепенно распространяющиеся и захватывающие новые части листа, в то время как соединения фтора вызывают более локализованные ожоги, достаточно ясно отграниченные от зеленой части листа.

Также установлено, что как инсектициды, соединения мышьяка, будучи приняты насекомым, вызывают расстройство пищеварения, в ряде случаев — некрозы стенок кишечника и, разносясь гемолимфой по телу, вызывают паралич дыхательных нервов.

Общеизвестны также признаки отравляющего действия препаратов мышьяка (и других) на организм человека; например, на коже, особенно в потных и влажных местах, пыль мышьяка вызывает раздражение, воспаление, сыпи и нарывы.

Поэтому указанные соединения относятся к ядам общеплазматического действия; симптомы, течение и исход от отравления ими растений, насекомых, животных и людей определяются дозой принятого яда и индивидуальным состоянием организма.

Предварительные опыты по токсическому действию ацетоновых экстрактов D. toxicum, F. poae, St. alternans на ростовую и стеблевую ткань ростков растений показали, что это действие аналогично: 1) действию этих экстрактов на ткани животных, выражающемуся в образовании некрозов тканей слизистых оболочек как при аппликации экстрактов на декапиллированную кожу кроликов, так и при скармливании экстрактов и убитых культур грибов и 2) действию на ткани листа общеплазматических ядов, как, например, соединений мышьяка, фтора и др., имеющему место в ряде случаев при применении этих ядов в качестве фунгицидов.

Для окончательной проверки некротического действия экстрактов испытываемых грибов на растительные ткани мы изучали действие их на листовую ткань различных вегетирующих растений. Нами было испытано свыше 15 видов растений; ацетоновые экстракты наносились на центральную жилку листа тонким шпателем до 3 мм шириной. Опыты проведены в нескольких повторениях, с учетом затененности листьев, влажности и других факторов (табл. 2).

Таблица 2

Действие ацетоновых экстрактов токсических грибов на листовую ткань вегетирующих растений

№ п/п.	Растение	Наименование экстрактов грибов		
		D. toxicum	St. alternans	F. rosae
1	Сирень	15-й день. Некротические пятна, темнозеленовато-буроватого цвета, резко очерчены выпуклой каймой с обеих сторон листа; сквозные. 30-й день. Некротические пятна, распространяющиеся вдоль жилок листа, бурого цвета; очерченные, сквозные		Легкое потемнение ткани. Слабое побурение ткани, не резко очерченные пятна; поверхностные
		При нанесении на нижнюю сторону листовой пластинки образуются некротические пятна		
2	Береза	3—5-й день. При нанесении экстрактов на верхнюю поверхность листовой клетки видимых изменений не обнаружено: на молодых верхушечных листьях в местах нанесения ткань светлобуроватая. При нанесении экстрактов на нижнюю сторону листовой пластинки, образуются очаговые, не резко очерченные некрозы (без выпуклой каймы)		
3	Вишня	5-й день. Бурого цвета некротические пятна, не резко очерченные	Незначительное потемнение ткани	Бурого цвета некротические пятна, не резко очерченные
4	Клен американский	3—4-й день. Резко очерченные выпуклой каймой, сквозные, обесцвеченные некротические пятна	Несколько слабее действие, чем у экстрактов D. toxicum	Резко очерченные выпуклой каймой, сквозные, обесцвеченные некротические пятна
5	Дикий виноград	4—5-й день. Резко очерченные выпуклой каймой пятна светлобурого цвета, сквозные	Некротические пятна главным образом у основания, по главной жилке листа	Резко очерченные, сквозные, светлобурые пятна
		На молодых листах пятна, менее очерченные		
6	Пион	При неоднократном повторении опытов не обнаружено видимых поражений клеток листовой ткани		
7	Георгина	Поверхностное, не резко очерченное поражение листовой ткани	Видимых признаков поражения тканей листа не обнаружено	Незначительное поверхностное поражение листовой ткани
8	Функия	Диффузное пожелтение и местами обесцвечивание ткани листа по поперечным жилкам	Незначительное пожелтение листовой пластинки	
9	Подорожник	Некротические, обесцвеченные пятна, сквозные, очерчены темнозеленой каймой	Некротические пятна меньших размеров, чем при действии экстрактов D. toxicum, сквозные, очерчены темной каймой	
10	Роза	7-й день. Незначительные очаги побурения ткани в местах нанесения	Видимых поражений на поверхности листовых пластинок не обнаружено	
11	Овес	На 3—5-й день обесцвеченные некротические пятна без четко выраженной выпуклой каймы	Обесцвеченные некротические пятна и полоски без каймы, менее выражены, чем при нанесении экстрактов D. toxicum	
12	Пшеница			

Нами также наблюдалась различная чувствительность испытываемых сортов злаков (овес — вятский, советский, флюгер; пшеницы — саратовская 0,62 и 0,69) к действию экстрактов токсических грибов, но мы на этих данных останавливаться не будем, так как они нуждаются в проверке на более широком материале.

Из вышеприведенного видим:

1. Некрозы, вызываемые экстрактами токсических грибов на листьях, имеют вид бурых пятен с четко окаймленными краями или без них или пятен обесцвеченных, сквозных, чаще нечетко окаймленных.

2. Наиболее остро выражено токсическое действие экстрактов D. toxicum, так, например, из всех испытуемых растений не обнаружено видимого действия их только на листьях пиона и отмечено очень слабое поражение ткани листьев георгины и розы.

3. Экстракты St. alternans и F. poae вызывают в ряде случаев более слабо выраженное образование некротических пятен на листьях испытуемых растений, чем экстракты D. toxicum, хотя в основном эти пятна похожи.

4. Некротическое действие ацетоновых экстрактов испытанных грибов на листовую ткань зависит от специфической реакции различных растений, определяемой целым рядом анатомических и физиологических признаков, рассмотрение которых не является предметом настоящего сообщения.

Выводы

1. Из испытанных нами водных, спиртовых, ацетоновых и эфирных экстрактов Dendrodochium toxicum, Stachybotrys alternans, Fusarium poae и Fusarium sporotrichoides наиболее остро выраженным токсическим действием обладают ацетоновые и эфирные экстракты, особенно D. toxicum. Токсическое действие выражается в гиперемии ткани, при нанесении капли экстракта на кожу кроликов, и образовании разлитых, медленно заживающих (до 10—15 дней) некрозов.

2. Нанесение экстрактов указанных грибов на листовую пластинку и стебель ростков подсолнечника, фасоли, а также на поверхность листовой пластинки вегетирующих растений сирени, березы, вишни, клена американского, дикого винограда, георгины, пиона, подорожника, овса, пшеницы, функии, розы вызывает образование некрозов в виде бурых с четкой выпуклой каймой или расплывчатых и обесцвеченных пятен.

3. Вследствие губительного действия как на растительную, так и на животную клетки токсические вещества, образуемые D. toxicum, St. alternans, Fusarium poae, Fusarium sporotrichoides, могут быть отнесены к категории ядов общеплазматического действия.

4. Изучение механизма действия токсических веществ указанных грибов на растительную клетку, а также специфичность реакций отдельных видов растений являются необходимым и важным этапом дальнейшей работы.

Институт микробиологии
им. Заболотного
Академии Наук УССР
Киев

Получено 15. II. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Підоплічка М. М. і Білай В. Й. Токсичні гриби на зерні хлібних злаків. Видавництво Академії Наук УССР, 1946.
2. «Стахиботриотоксикоз». Сборн., Изд. Акад. Наук УССР (в печати), 1947.
3. «Кормове отруення коней» (Дендродохиотоксикоз), Сборн., Изд. Акад. Наук УССР, 1947.
4. Пидопличка Н. М. и Билай В. И. Новый токсический гриб Dendrodochium toxicum. ДАН СССР, т. LVI, 1947.

СПОРОВАЯ ЭПИФИТНАЯ МИКРОФЛОРА ЗЕРНА ПШЕНИЦЫ

Л. Ю. Медвинская и *В. С. Рождественский*

Исследованию эпифитной микрофлоры до настоящего времени уделяли мало внимания. Между тем вопрос этот имеет значительный теоретический и практический интерес. С эпифитной микрофлорой мы встречаемся во всех областях промышленности, где перерабатывается растительное сырье или сохраняются продукты растительного происхождения (зерно, овощи, плоды). Особенный интерес представляет исследование эпифитной микрофлоры зерна пшеницы при изучении проблемы ослизнения хлеба. Как показали наши исследования, явление ослизнения хлеба зависит от количественного и видового состава микрофлоры зерна и муки. Так, нами было установлено, что хлеб, выпеченный из муки, содержащей Bac. mesentericus в количестве свыше 100 зародышей на 1 г зерна, обычно обнаруживал резко выраженное явление ослизнения. Где размножаются возбудители ослизнения хлеба, до сих пор не выяснено. Возможно, что Bac. mesentericus размножается на собранном зерне или в муке в результате неправильного хранения. Не исключена возможность и того, что эти микроорганизмы имеются в большом количестве на зерне еще в поле как нормальная составная часть эпифитной микрофлоры злаков.

Из работ Burri [7], Düggeli [8] и Wöller [11], посвященных изучению эпифитной микрофлоры злаков, известно, что на этих растениях живут преимущественно бактерии группы coli-aerogenes, Bact. herbicola, Bact. fluorescens и несколько спорообразующих видов.

По мнению Бурри, споровые бактерии относятся к неспецифической эпифитной микрофлоре растений, потому что они не размножаются на поверхности растений. Наиболее полные данные относительно эпифитной микрофлоры злаков мы встретили в работе Веллера. Исследуя эпифитную микрофлору пшеницы, ржи, ячменя и овса во время вегетационного периода, Веллер пришел к заключению, что микрофлора названных злаков зависит от метеорологических факторов — в первую очередь от количества осадков, температуры и влажности. По данным Веллера, в сухие жаркие периоды на злаках, как правило, много спороносных видов; наоборот, в дни с большим количеством осадков спороносные виды совсем исчезают с поверхности растений. Так, в апреле Веллер наблюдал только единичные спорообразующие бактерии на пшенице, в июне спороносные вместе с Bact. herbicola составляли 40% всей микрофлоры. Позже наступал период уменьшения спороносных бактерий — в июле их было только 20%, а в августе микрофлора хлебных злаков состояла исключительно из молочнокислых бактерий. Из работы Веллера видно, что споровая микрофлора не является обязательной составной частью эпифитной микрофлоры злаков. Это мнение разделяет и Мишустин. Приведенные литературные данные дают мало указаний о распространенности спороносных бактерий на созревшей пшенице. Целью нашей работы было выяснить распространенность спороносных бактерий на зерне спелой пшеницы, стоящей в поле на корню. Особенно нас интересовало наличие возбудителей ослизнения хлеба Bac. mesentericus. Для того чтобы выяснить зависимость состава эпифитной микрофлоры зерна пшеницы от метеорологических условий, исследование проводилось на протяжении трех лет.

Экспериментальная часть

Методика

В течение 1935—1937 гг. между 7 и 29 июля во время жатвы было собрано 42 образца пшеницы на полях лесостепи и полесья Киевской области УССР.

Пробы брали далеко от дороги в разных местах большого поля пшеницы. Стерильными ножницами срезались в стерильную посуду 15—20 колосьев здоровой пшеницы.

Для выделения споровой микрофлоры мы вначале пользовались следующей методикой: навеску колосьев заливали определенным количеством стерильной водопроводной воды и тщательно встряхивали в колбе. Смыв разводился от 1 : 10 до 1 : 100 млн., разведения засевали в разные элективные среды (МПБ, МПА, бульон с глюкозой, сусло, среда Рушмана). Уже первые ориентировочные исследования показали, что методику посевов нужно изменить: бесспоровые бактерии вырастали в таком колоссальном количестве, что заглушали споровую микрофлору. Поэтому нами была разработана методика определения качественного и количественного состава эпифитной микрофлоры зерна.

Для определения видового состава мы употребляли непосредственный посев зерна в агар бородкой или зародышем, а для количественного анализа применили метод дифференциального прогрева.

Навеску колосьев 15—20 г заливали стерильной водой, тщательно встряхивали в течение 5 минут. Смыв прогревали при разной температуре (80° — 20 мин.; 100° — 15 мин.); затем делали разведения от 1 : 10 до 1 : 100 000; из каждого разведения по 1 мл засевали в МПБ. Такой метод давал возможность: а) освободиться от бесспоровой микрофлоры, б) дифференцировать разные виды спороносных бактерий по разной теплостойкости спор, в) определить количество спор на 1 г зерна методом титров.

Чистые культуры изучали и идентифицировали по определителям Bergey и Lehmann и Neumann.

Количественный и видовой состав спороносной эпифитной микрофлоры

Чтобы иметь представление о количестве и видовом составе всей эпифитной микрофлоры пшеницы, чтобы выяснить соотношение между спороносными и бесспоровыми бактериями, мы сделали ориентировочные исследования всей эпифитной микрофлоры пшеницы (9 проб). Несмотря на небольшое количество наблюдений, были получены довольно интересные результаты. В 1935 г. в июле, когда выпало большое количество осадков, была выявлена чрезвычайно богатая микрофлора (от 10 млн. до 100 млн. зародышей на 1 г зерна), состоящая почти исключительно из бесспоровых бактерий: Bact. herbicola, Bact. coli var. luteoliquefaciens, Bact. fluorescens, Bact. vulgare (Proteus vulgaris). Среди них спороносных бактерий было сравнительно мало — не больше 1 000 зародышей на 1 г зерна. Наоборот, в июле 1936 г., когда выпало мало осадков (табл. 1), бесспоровые бактерии тех же видов обнаружены только в количестве 10—100 зародышей на 1 г зерна пшеницы, тогда как количество спороносных бактерий осталось такое же, как и в 1935 г. Эти данные показывают, что метеорологические условия 1935 г. действительно способствовали размножению бесспоровых бактерий, но не оказали заметного влияния на количество споровой микрофлоры.

Нами было установлено, что для выделения отдельных видов спороносных бактерий нужно употреблять дифференциальную методику прогрева, иначе можно некоторые виды вовсе не обнаружить. Так, Bac. cereus, Bac. megatherium, Bac. subtilis можно с одинаковым успехом

Таблица 1

Метеорологическая характеристика *

	Среднесуточная температура в градусах и ее колебания		
	1935 г.	1936 г.	1937 г.
Июнь	19,9 $\frac{14,4}{24,9}$	19,1 $\frac{14,4}{24,5}$	19,6 $\frac{13,7}{25,7}$
Июль	17,5 $\frac{12,8}{22,3}$	25,6 $\frac{19}{32,1}$	19,9 $\frac{14,8}{25,8}$
Август	18,7 $\frac{13,5}{24,2}$	18,2 $\frac{14,0}{23,5}$	19,2 $\frac{15,7}{24,2}$
	Осадки в мм за месяц		
Июнь	16,9	68,5	17,4
Июль	67,3	6,6	67,4
Август	62,6	103,0	160,0
	Инсоляция в часах за месяц		
Июнь	323,5	274,0	336,2
Июль	252,4	385,4	271,0
Август	263,7	195,5	194,3

* Данные Киевской метеорологической станции.

Таблица 2

Общее количество спороносных бактерий на 1 г пшеницы

Количество спор на 1 г зерна	Количество проб в отдельные годы			Всего
	1935	1936	1937	
0	—	—	—	—
Меньше 10	1	1	—	2
10	1	6	10	17
100	3	4	12	19
1 000	2	—	2	4
Всего . .	7	11	24	42

выделить как путем непосредственного посева зерна в агар, так и при прогреве при 80° — 20 мин. и 100° — 1 мин. Bac. mycoides, Bac. adhaerens легче всего обнаружить путем посева зерна в агар, а Bac. migrans n. sp. — при прогреве при 80° — 20 мин. и 100° — 1 мин. Оптимальная температура для выделения Bac. mesentericus 80° при прогревании в течение 20 мин. и 100° — 15 мин.

Несмотря на разнообразные метеорологические условия в эти годы (табл. 1), общее количество спороносных бактерий колебалось незначительно: из 42 исследованных проб в 36 (85,7%) обнаружено от 10 до 100 зародышей на 1 г зерна, в 4 пробах выявлено 1 000 спороносных бактерий на 1 г и только в 2 пробах количество спороносных бактерий было меньше 10 зародышей на 1 г зерна (табл. 2).

Что касается Bac. mesentericus, то споры этого вида встречаются в составе эпифитной микрофлоры зерна пшеницы в еще меньшем количестве. Так, из 42 исследованных проб зерна 8 проб совсем не имели представителей этого вида на 1 г зерна, в большинстве проб (32) количество спор Bac. mesentericus колебалось от 1 до 10 зародышей на 1 г зерна. Ни разу мы не могли обнаружить 1 000 спор (табл. 3).

Таблица 3

Количество спор Bac. mesentericus на 1 г зерна пшеницы

Количество спор на 1 г зерна	Количество проб в отдельные годы			Всего
	1935	1936	1937	
0	4	2	2	8
10	1	5	13	19
10	1	3	9	13
100	1	1	—	2
1 000	—	—	—	—
Всего . .	7	11	24	42

Видовой состав споровой эпифитной микрофлоры зерна был довольно однообразен и в большинстве проб состоял из 3—6 видов. Чаще всего мы наблюдали Bac. cereus, затем Bac. mesentericus и Bac. saccharolyticus n. sp.

Таблица 4

Видовой состав споровой эпифитной микрофлоры зерна пшеницы

Частота обнаружения	Вид и автор	Количество культур
1	Bacillus cereus (Frankland)	33
2	» mesentericus (Trevisan)	47
3	» saccharolyticus n. sp. (Непомнящая и Либерман) . .	44
4	» migrans (Рождественский и Медвинская)	24
5	» mycoides Flügge и B. adhaerens (?)	17
6	» subtilis (Cohn)	12
7	» megatherium (de Bary)	11
8	» petasites	3
9	» laterosporus [Laubach (?)]	2
10	» asterosporus (Meyer)	1
11	» albolactis	1
	Итого	215
	Не определено	70

Названные в табл. 4 виды без исключения относятся к аммонифицирующим бактериям, встречающимся в почве. Это относится также и к Bac. migrans. n. sp.

Всего было изучено 285 выделенных культур, из них 215 удалось определить, а 70 идентифицировать по определителям Бердже, Леман и Нейман не удалось.

На основании работы Медвинской «Изменчивость Bac. mesentericus» мы считаем возможным часть выделенных культур отнести к вариантам Bac. mesentericus. Можно полагать, что и остальные не определенные нами культуры также принадлежат к вариантам других видов спороносных бактерий.

Подводя итоги проведенным исследованиям, можно сказать, что споровая эпифитная микрофлора встречается на зерне регулярно, но в небольшом количестве. Мы не могли констатировать больших колебаний в количестве спороносных бактерий в зависимости от метеорологических условий. Очевидно, размножение группы спороносных бактерий не происходит на зерне пшеницы, стоящей в поле на корню.

Выводы

В результате изучения 42 проб зерна пшеницы мы пришли к следующим выводам.

1. На зерне пшеницы, собранной стерильно в поле во время жатвы, спороносные бактерии встречаются регулярно, но в небольшом количестве: от 10 до 100 зародышей на 1 г (36 проб — 85,7%), 1 000 зародышей (4 пробы — 9,5%).

2. Споры Bac. mesentericus обнаружены в 32 пробах — 76,1% — в количестве от 1 до 10 спор на 1 г и только в 2 пробах обнаружено 100 спор этого вида.

3. Мы не могли установить прямой зависимости между метеорологическими условиями и составом споровой эпифитной микрофлоры зерна. Количественный и видовой состав споровой эпифитной микрофлоры зерна пшеницы был приблизительно одинаков в июле 1936 г., когда было мало осадков, и в июле 1937 г. с достаточно большим количеством осадков.

4. Результаты исследований находятся в большой зависимости от примененной методики. Значительное количество видов спороносных бактерий удается выделить из зерна только после дифференциального прогрева. Без прогрева бесспоровые бактерии, особенно во влажные годы, заглушают споровую микрофлору.

5. Споровая эпифитная микрофлора зерна чаще всего представлена 9 видами. Эти виды по частоте нахождения распределяются в таком порядке: Bac. cereus, Bac. mesentericus, Bac. saccharolyticus n. sp., Bac. migrans n. sp., Bac. mycoides, Bac. subtilis, Bac. megatherium.

Институт микробиологии
им. Заболотного
Академии Наук УССР
Киев

Получено 28. VIII. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Медвинська Л. Вплив мікробіологічних процессів на зберігання білків у силосі ссоки. Мікробіологічний журн. УАН, т. II, стр. 89, 1935.
2. Медвинська Л. Мінливість групп Bac. mesentericus і спроба нової класифікації. Мікробіологічний журн. АН УССР, т. VIII, № 2—3, 1946.
3. Мишустин Е. Н. Научные основы силосования кормов. Москва, 1933.
4. Непомняща Л. та Ліберман Л. Новий від осмофільної спорносної газоутворюючої палички. Bac. saccharolyticus n. sp. Микроб. журн. АН УССР, № 2, 1938.
5. Рождественский В., Медвинская Л. и Середенко Л. Возбудители ослизнения хлеба, Киев, 1936.
6. Рождественський В. та Медвинська Л. Феномен рухливості колоній у нового виду Bac. migrans n. sp. Мікробіологічний журн., т. V, № 2, 1938.
7. Burri. Die Bakterienvegetation auf der Oberfläche normal entwickelter Pflanzen. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 10, S. 758, 1903.
8. Düggeli M. Die Bakterienflora gesunder Samen und daraus gezogener Keimpflanzen. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 12, S. 602; Bd. 13, S. 56, 1906.
9. Henneberg W. Handbuch der Gärungsbakteriologie, Bd. II, S. 249, 1926.
10. Ruschmann und Koch. Die Milchsäurebakterien auf den zur Einsäuerung gelangenden Grünfutterpflanzen. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 80, S. 1; Bd. 81, S. 11, 1930.
11. Wöller. Epiphytische Bakterienflora gesunder grüner Pflanzen. Ctbl. Bakt., Abt. II, Bd. 79, № 8/14, 1929.

ХАРАКТЕРИСТИКА МИКРОФЛОРЫ СОЛЕНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ ТАМАНСКОГО ПОЛУОСТРОВА

М. А. Мессинева

Соленоводные и солоноватоводные водоемы Таманского полуострова, в большинстве мелкие, застойные бассейны, являются типичными районами накопления органических битуминозных осадков. Изучение микробиологических процессов, протекающих в иловых отложениях, весьма существенно для разрешения вопроса о происхождении ископаемых органических пород.

Микрофлора морских осадков изучается в лаборатории Исаченко [1]. Отложения грязевых озер описаны в работах Рубенчика [3], Кузнецова [2]. Новое в познание микробиологических процессов в воде и иловых отложений моря внесли работы ZoBell [4], которые показали участие микроорганизмов не только в процессе седиментации, но и в литогенезе осадков.

Микробиологические работы, описываемые ниже, проводились в 1939 г. по распоряжению акад. И. М. Губкина комплексной экспедицией, посвященной изучению органического вещества донных отложений (руководитель работ проф. С. Н. Скадовский). Пробы илов были взяты асептически; подсчет содержания микроорганизмов производился немедленно после взятия образца. Попутно было определено количество микроорганизмов в воздухе над водоемами, при этом была установлена весьма малая вероятность попадания воздушной микрофлоры во взятые образцы илов.

После микробиологических анализов пробы ила использовались для производства ряда химических определений: влаги, потери при прокаливании, некоторых зольных элементов и органических составных частей. Количественно устанавливалась ферментативная активность илов. Произведенные определения показали, что содержание органического вещества сильно уменьшается по мере погружения в ил. Биомасса бактерий и других микроорганизмов составляет в некоторых осадках значительную часть органического вещества. Для этих случаев вполне применимо предположение о «вторичности» органического вещества осадков, так как первоначально содержащиеся в нем компоненты уже разложены, а новые аккумулированы в телах бактерий.

Определение общего количества гетеротрофных микроорганизмов

Общее содержание гетеротрофных бактерий устанавливалось на МПА, количество грибной микрофлоры учитывалсь на МПА при pH = 5,5. Посевы производились после приготовления разведений навески ила на стерилизованной морской воде или рапе того водоема, из которого были взяты пробы. Все питательные среды также изготовлялись на морской воде или рапе озер.

Наибольшее количество гетеротрофных микроорганизмов содержали отложения лиманов Тузлянского и Ахтанизовского (табл. 1).

В Азовском море 1 г поверхностного слоя ила содержал более полумиллиарда бактерий, из них около одной трети пигментных форм.

Для Таманского залива получены цифры того же порядка. На глубине 140 см отложения Таманского залива более бедны микроорганизмами, количество же пигментирующих видов почти не изменяется.

Таблица 1

Гетеротрофная микрофлора илов

Место взятия образца	Дата	Глубина от поверхности ила в см	Бактерии (тыс./г)		Грибы
			общее число	пигментные	
Азовское море	12/VI	0—20	544 360	181 450	40 320
Ахтанизовский лиман	26/VI	0—40	200 000	—	—
		125	200 000	—	—
Соленое озеро	25/V	0—3	155 757	3 900	Нет
		3—15	290 828	55 900	»
		18—20	16 760	8 380	»
Таманский залив	19/VI	0—50	504 433	102 390	683
		140	22 680	9 000	Нет
Тузлянский лиман	7/VI	2—15	255 000	12 230	»
		30—40	1 453 900	Нет	»

Грязевые отложения Соленого озера содержат значительно меньше сапрофитных бактерий, пигментные формы, однако, составляют значительную часть от общего количества. Это обстоятельство необходимо отметить в связи с недавними работами ZoBell [5], который, изучая микробное население морских осадков, нашел много пигментобразующих видов. Пигментные бактерии, как считает ZoBell [5], содержат каротиноиды и поэтому способны к накоплению соединений углеводородного характера.

Интересно отметить, что при посеве поверхностной грязи Соленого озера и Таманского залива был обнаружен рост характерных колоний Bac. mycoides в количестве десятков тысяч на 1 г сухого ила. В других илах и в более глубоких образцах из этих же водоемов Bac. mycoides не отмечено. Грибная микрофлора в большинстве исследованных илов не находит подходящих условий для своего развития. Рост получен только при посеве образцов из Азовского моря и Таманского залива.

Подсчет количества актиномицетов (МПА и агар Чапека) показал, что они содержатся не во всех отложениях. Много актиномицетов в поверхностной грязи Тузлянского лимана —73 350 тысяч на 1 г сухой грязи, и в поверхностном слое донного осадка Таманского залива — 6 820 тысяч на 1 г. Другие отложения не содержат сколько-нибудь значительного количества актиномицетов.

Разложение белков с образованием газа

В дополнение к подсчетам общего количества микроорганизмов, растущих на белковых средах, было установлено присутствие бактерий, разлагающих белковые вещества с образованием газов.

Посев производился в количестве 1 см^3 соответствующего разведения иловой болтушки на среду Зельтера (казеин или пептон — 10,0 г, Na_2HPO_4 — 5 г, $MgSO_4$ — 1 г, морская вода — 1 000 мл), разлитую в бродильные трубки. Некоторые из испытанных образцов не вызывали образования газа. К таким относятся образцы из отложений Тузлянского лимана. При посеве их, несмотря на хорошее развитие микроорганизмов, газообразования не наблюдалось. Отложения Соленого озера, напротив, вызывали усиленное газообразование: в поверхностном слое отложения количество клеток газообразующих микроорганизмов превышало 20 000 на 1 г ила, в глубинном сильно минерализованном образце оно составляло 250 клеток на 1 г.

Морские осадки Таманского залива и Азовского моря также содержали газообразующую микрофлору в количестве нескольких десятков тысяч на 1 г ила.

Денитрификация

Для обнаружения денитрифицирующих бактерий посевы производились на среду van Iterson с лимоннокислым Са в присутствии бромтимолблау. Денитрификация учитывалась по газообразованию, изменению окраски индикатора и по наличию роста микроорганизмов. Количество микроорганизмов, восстанавливающих нитраты, выражалось десятками, реже сотнями тысяч клеток на 1 г сухого вещества (табл. 2).

Таблица 2

Содержание микроорганизмов различных физиологических групп

Место взятия пробы	Глубина от поверхности ила в см	Денитрификаторы	Разлагающие клетчатку			Разлагающие жир	
			аэробные		анаэробные	аэробные	анаэробные
Азовское море	0—20	$404 \cdot 10^3$	1 785		Разрушение клетчатки сопровождается десульфуризацией	359 000	Нет
Ахтанизовский лиман	0—40	$500 \cdot 10^3$	5 000		Разрушение клетчатки	20 000	200
	195	$500 \cdot 10^3$	9 900	Преобладает Cytophaga Hutch.	Разрушение клетчатки, полная мацерация	500 000	200
	0—3	$17 \cdot 10^3$	1 660		То же	20 000	1 667
Соленое озеро	3—15	$52 \cdot 10^3$	1 560		Разрушение клетчатки слабое	25 000	2 604
	18—20	$8 \cdot 10^3$	21		Разрушение клетчатки, десульфуризация	10 000	100
Таманский залив	0—50	$205 \cdot 10^3$	690	Преобладает Cellvibrio	Разрушение клетчатки слабое	3 000	200
	140	$18 \cdot 10^3$	45		Разрушение клетчатки довольно интенсивное	3 000	100
Тузлянский лиман	2—15	$97 \cdot 10^3$	8 200 смешанный состав микрофлоры		Разрушение клетчатки слабое	270 000	Нет
	30—40	$37 \cdot 10^3$	600 То же		Разрушение клетчатки интенсивное, мацерация	26 000	»

В глубинных слоях отложений Таманского залива, Тузлянского лимана и Соленого озера денитрификаторов меньше, чем в поверхностных.

Разложение клетчатки

Разложение клетчатки в грязевых отложениях было впервые изучено Исаченко, которым выделены и описаны несколько специфических микроорганизмов, разрушающих клетчатку в аэробных и анаэробных условиях. Рубенчик установил, что вещества, образующиеся при разложении клетчатки, могут быть использованы для десульфуризации.

В условиях Таманской экспедиции количество аэробных организмов, разлагающих клетчатку, определялось посевом разведений ила на среду Гетчинсона.

Аэробная микрофлора, разлагающая клетчатку, представлена в соленоводных илах тысячами клеток на 1 г сухого вещества. Наибольшее количество целлюлозных бактерий содержится в отложениях Ахтанизовского лимана (табл. 2), наиболее часто встречается Cytophaga Hutchinsonii. В Таманском заливе целлюлозные бактерии представлены в основном Cellvibrio. Смешанная микрофлора поверхностного слоя Тузлянского лимана резко уменьшается с глубиной как в количественном, так и в качественном отношении.

Соленое озеро также показывает значительное уменьшение содержания бактерий, разрушающих клетчатку, по мере погружения в толщу иловых отложений.

Анаэробное разложение клетчатки учитывалось в запаянных ампулах на среде Омелянского. В большинстве образцов анаэробный распад клетчатки проходил очень бурно и сопровождался выделением газов. Отрицательный результат получен только при посеве поверхностного ила Соленого озера.

Разложение жира

Разложение жира микроорганизмами соленоводных водоемов уже неоднократно отмечалось в литературе. Обогащение осадочных пород битумами находится в связи с относительными скоростями осадконакопления и консервации жировых и битуминозных веществ.

В настоящей работе учитывались микроорганизмы, способные разлагать жиры в анаэробных и аэробных условиях на минеральной среде. Состав среды для обоих процессов был одинаков: морская вода или рапа — 1 000 мл, K_2HPO_4 — 5 г, $(NH_4)_2HPO_4$ — 5 г, $MgSO_4$ — 1,0 г, оливковое масло — по 2 мл в каждую колбочку. Для посевов в аэробных условиях среда разливалась в колбы Эрленмейера, для анаэробных форм — в большие ампулы, которые затем запаивались. Результаты этих определений помещены в табл. 2. Поверхностный слой ила в Азовском море содержал анаэробных разрушающих жир бактерий. Аэробные организмы составляли более 350 тысяч в 1 г сухого веса. Развитие аэробных форм на оливковом масле в некоторых случаях сопровождалось флуоресценцией жидкости. Отложения Ахтанизовского лимана вызывали развитие белой бактериальной пленки на границе между жидкой средой и жиром. Определить точное количество соответствующей микрофлоры не удалось.

В Таманском заливе содержание разрушающих жир бактерий в поверхностном и глубинном слое почти одинаково. Разложение жира сопровождалось образованием белой пленки, а в отдельных случаях — десульфуризацией.

Поверхностная черная грязь Тузлянского лимана содержала в десять раз больше аэробных разрушающих жир бактерий, чем более глубокий слой погребенного вала из морской травы (Zostera). Анаэробные формы в Тузлянском лимане встречаются единично.

Илы Соленого озера, напротив, содержат значительное количество анаэробных разрушающих жир бактерий. При наибольших разведениях зона роста всегда имеет черную окраску. В аэробных условиях также часто наблюдалось появление черного осадка на дне колб и обильное газообразование. Самый глубокий, сильно минерализованный слой отложения содержал значительно меньше липолитических организмов, чем поверхностные слои.

Кроме посевов на питательные среды, с илами Соленого озера были поставлены опыты по определению скорости разложения жира. Для этой цели 50 г свежего ила смешивались в стеклянной чашке Петри с 2 мл оливкового масла. Через 10—14 дней можно было видеть явные признаки разложения масла: появился специфический «горький» запах, на поверхности ила можно было видеть развитие аэробных жирорасщепляющих микроорганизмов, нижний слой ила почернел. После извлечения остатков жира серным эфиром в микроаппарате Сокслета были получены следующие результаты: внесено жировых веществ 1,5362 г; остаток после воздействия микроорганизмов 1,2876 г; разрушено 0,2486 г, т. е. 16,14% от внесенного количества.

При аналогичных условиях разложение жира в образце с 5—15 см глубины произошло на 17,81% от внесенного количества. Поверхность ила оставалась серовато-бурой, снизу — почернение. Плотный минерализованный ил с глубины отложения мало изменил количество внесенного жира (разложено было всего 2,63%), но вызвал бурное развитие пигментных палочковидных форм. Очевидно, в этом слое жироподобные вещества аккумулируются бактериями

Десульфуризация

Для определения количества десульфурирующих микроорганизмов посевы производились в пробирки, наполненные на $^2/_3$ питательной средой следующего состава: морская вода — 1 000 мл, молочнокислый натрий — 5 г, аспарагин — 1 г, сернокислый магний — 1 г, K_2HPO_4 — 0,5 г, $FeSO_4$ — следы, агар-агара 1%, pH среды доводился до 7,4. Перед посевом среда была расплавлена и охлаждена до 40°. В каждую пробирку вносился 1 мл соответствующего разведения ила и тщательно перемешивался. После застывания агара пробирка заливалась до верха 2% водным агар-агаром, закрывалась пробкой и замазывалась менделеевской замазкой.

При таком методе (очень удобном в экспедиционных условиях) был получен прекрасный рост десульфурирующих бактерий, ясное почернение того участка агар-агара, который находился вблизи развившихся колоний десульфурирующих бактерий. Контрольные пробирки всегда оставались стерильными.

Наибольшее количество клеток десульфурирующих микроорганизмов содержал образец ила Таманского залива с глубины 0—50 см (табл. 3).

Другие образцы илов содержали лишь несколько десятков клеток десульфурирующих микробов.

Желая установить, является ли такое небольшое количество жизнеспособных клеток достаточным для того, чтобы при наличии сульфатов восстановить их до сероводорода, мы поставили дополнительные лабораторные опыты. В склянки на 65 мл вносилась смесь солей для питательной среды. После стерилизации в автоклаве склянки наполнялись свежим илом, закрывались и запаивались. В большинстве случаев через небольшой промежуток времени появлялась специфическая черная окраска и запах. Далее — производились посевы небольшого количества содержимого склянок в ампулы с жидкой средой ван-Дельдена. Культуры, полученные в ампулах, перевивались повторно. Большин-

Таблица 3

Восстановление сульфатов в соленоводных илах

Водоем	Глубина от поверхности ила в см	Количество десульфурирующих бактерий в 1 г ила	Десульфуризация при внесении сульфатов в ил		
			общий вид склянки	1-й пересев	2-й пересев
Азовское море	0—20	36	Черная окраска. Запах H_2S	H_2S рост	H_2S рост
Ахтанизовский лиман	0—40	10	Основной цвет светлый. Серо-черные прожилки. Запах H_2S слабый	H_2S рост	H_2S рост
	125	6	Окраска светлая. Редко черные полоски. Запах H_2S слабый	H_2S рост слабый	Нет роста
Соленое озеро	0—3	100	Окраска черная. Сильный запах H_2S	H_2S рост слабый	H_2S рост
	5—15	100	Черная окраска. Резкий запах. Повышенное давление газов	H_2S хороший рост	H_2S хороший рост
	18—20	100	Серо-черные прожилки очень редки. Запаха нет	Нет роста	Нет роста
Таманский залив	0—50	10 344	Черные полоски в иле. Резкий запах. Повышенное давление газов	H_2S рост	H_2S рост
	140	10	Окраска светлая. Запах слабый	Нет роста	Нет роста
Тузлянский лиман	2—15	8	Окраска равномерно-черная. Резкий запах H_2S. Повышенное давление газов	H_2S рост	H_2S рост
	30—40	10	Черная окраска. Резкий запах. Повышенное давление газа	H_2S рост	H_2S рост

ство из выделенных таким образом культур оказались идентичными с Microspira desulfuricans.

Для восстановления внесенных в ил сульфатов оказалось совершенно достаточным наличие даже небольшого количества клеток десульфурирующих бактерий. В глубинных слоях отложений Ахтанизовского лимана и Таманского залива сульфаты практически не восстанавливались.

Выводы

1. Иловые отложения исследованных соленоводных водоемов Таманского полуострова содержат большое количество микроорганизмов разнообразных физиологических групп.

2. Илы Азовского моря и Таманского залива показывают уменьшение общего содержания микроорганизмов в толще отложения.

3. Отложения Ахтанизовского лимана и Соленого озера отличаются преобладанием бактерий денитрифицирующих, разлагающих клетчатку и жировые вещества.

4. Микрофлора погребенного вала из остатков морской травы (Zoster) в Тузлянском лимане оказалась богаче микрофлоры покрывающей его черной жидкой грязи. Таким образом, сохранение структурных остатков растений в этом слое не может быть объяснено недостаточным развитием бактерий.

5. Для познания истинной глубины и скорости протекания микробиологических процессов недостаточно общего учета содержания микроорганизмов или подсчетов по физиологическим группам. Необходимо дополнять эти исследования постановкой опытов с испытанием активности присутствующей микрофлоры. Подобные попытки, осуществленные в отношении липолитических и десульфурирующих бактерий, показали, что наличие даже небольшого числа активных возбудителей процесса при благоприятных условиях может повести к большим масштабам превращений.

Институт горючих ископаемых
Академии Наук СССР
Москва

Получено 16.VIII.1946

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаченко Б. Л. Обзор работ по микробиологии грязей и минеральных источников. Микробиология, т. VII, вып. 4, 1938.
2. Кузнецов С. И. Количественный учет микрофлоры в связи с разработкой микрозонального показателя грязей. Микробиология, т. VII, вып. 1, 1938.
3. Рубенчик Л. И. К микробиологии грязевых озер. Микробиология. т. XIII, вып. 6, 1944.
4. ZoBell. Marine Microbiology. Waltham, Mass. USA Chronica Botanica Company. 1946.
5. ZoBell and Anderson. Vertical distribution of bacteria in marine sediments. Bull. Am. Ass. Petr. Geol., v. 20, p. 258, 1936.

ВОЗБУДИТЕЛИ МЯГКОЙ ГНИЛИ СЕМЕННИКОВ КАПУСТЫ

Л. П. Старыгина и Н. А. Шишелова

Мягкая гниль была обнаружена на растениях, принадлежащих к различным семействам. Она была отмечена как при хранении их в подвале (клубни картофеля, корни моркови, турнепса, лука и др.), так и при выращивании растений в грунте (капуста, ирис, орхидея и др.). Таким образом, этому заболеванию подвергаются различные части растения как содержащие хлорофилл (зеленые), так и не содержащие его (корни, клубни). Трудно предположить, чтобы все эти случаи заболевания были однородны. Тем не менее все они объединяются под общим названием — мягкая гниль. Это объясняется тем, что по принятому фитопатологами определению мягкая гниль является таким видом заболевания, при котором гниение сопровождается сильным размягчением ткани. Такое определение охватывает по существу всевозможные случаи загнивания сочных частей растений.

При объединении под одним названием целого ряда поражений естественны те трудности, которые возникали при идентификации возбудителей мягкой гнили. Изучение их, начатое еще в 1900 г., продолжается до настоящего времени.

Работы первого периода характеризовались тем, что был описан целый ряд возбудителей мягкой гнили, выделенных из различных сельскохозяйственных культур [23].

Bac. carotovorus Jones	(1900)	из моркови
» oleraceae Harrison	(1902)	из цветной капусты
» omnivorus van Hall	(1902)	из касатики
» atrosepticus van Hall	(1903)	из картофеля
» phytophthorus Appel	(1903)	из картофеля
» aroideae Townsend	(1904)	из белокрыльника
» solanisaprus Harrison	(1906)	из картофеля
» melonis Giddings	(1910)	из дыни
» melonogenes Pethybridge and Murphy	(1911)	из картофеля
» apiovorus Wormald	(1913)	из сельдерея
» disolvens Rosen	(1926)	из кукурузы
» papaveris Ram Ayyar	(1927)	из мака

Характерной особенностью приведенных выше культур являлось то, что все они были способны к перекрестному заражению. Так, еще по данным Jones [15], выделенная им из моркови культура Bac. carotovorus была способна заражать, кроме корней моркови, также корни репы, редьки, плоды томатов, перца, апельсины, бананы, яблоки, вишни, листья гиацинтов, капусты, лук, сельдерей, пастернак, картофель. Последующие исследования в том же направлении с другими возбудителями мягкой гнили также указывают на способность их к поражению целого ряда растений.

Отсутствие у возбудителей мягкой гнили специфичности при заражении растений послужило основанием для проведения ряда работ с целью доказательства идентичности этих бактерий. В этих работах использовались различные методы сравнения (серологический, изучение морфологических, культуральных и физиологических особенностей, патогенность). Однако если одним исследователям (Harding and Morse [12], Leach [19], Bonde [9], Jennison [14]) удавалось установить, что отдельные возбудители близки между собой, то другие (Massey [21], Link [20], Dowson [10], Lacey [17]) приходили к противоположному выводу. Сторонники идентичности этих бактерий предлагали объединить их под одним названием. Так, Leah [19] считает, что Bac. phy-

tophtorus, Bac. atrosepticus, Bac. solanisaprus и Bac. melanogenes только штаммы ранее описанного вида Bac. carotovorus. Stapp [24] также предлагает объединить возбудителей мягкой гнили в одну группу — Bac. phytophthorus, хотя и считает, что Bac. carotovorus и Bac. phytophthorus принадлежат к различным серологическим группам. Поскольку по данному вопросу получаются разноречивые данные, вопрос об идентичности возбудителей мягкой гнили остается открытым и до настоящего времени является объектом изучения. Мы полагаем, что это зависит не только от особенностей возбудителей, но также и от того, что еще недостаточно доказана однородность их в пределах каждого растения.

Накопленный в течение ряда лет материал позволяет все же отметить некоторые характерные особенности этой группы бактерий. Так, многие авторы отмечают большую вариабильность их морфологических и культуральных признаков. Отмечена также легкая потеря вирулентности этих бактерий при хранении культуры в лабораторных условиях. Культуры обладают исключительным разнообразием в отношении своего патогенеза; все они неспецифичны при заражении растений (перекрестное заражение). Для некоторых показана способность к заражению как клубней и корней, так и зеленого растения. Имеются культуры, способные вызывать иной, кроме мягкой гнили, тип поражения. Так, Bac. phytophthorus, который, по многим данным, совершенно идентичен с Bac. carotovorus, вызывает почернение стеблей картофеля — заболевание, которое носит название «черной ножки».

У многих культур обнаружена способность к выделению ферментов, разлагающих пектиновые вещества, присутствием которых отдельные исследователи пытаются объяснить их способность к заражению растений.

Имеются работы, указывающие на близость этих бактерий к сапрофитам. Elrod [11] высказывает предположение о происхождении этой группы бактерий от группы coli-aerogenes. Окончательное решение всех этих вопросов не может быть получено до тех пор, пока не будет решен вопрос о том, представляют ли все эти бактерии один вариабильный вид или группу различных, обладающих близкими свойствами бактерий, принадлежащих к различным видам.

В литературе очень мало данных, посвященных специально мягкой гнили капусты. В большинстве случаев она изучалась попутно с другими сельскохозяйственными культурами. Капуста поражается всеми приведенными выше бактериями. В 1902 г. Harrison [13] выделил из цветной капусты культуру, которую он назвал Bac. oleraceae. Последняя, помимо цветной капусты и ряда других растений, вызывала также и гниль обыкновенной капусты. В дальнейшем была доказана идентичность этой культуры с Bac. carotovorus (Harding and Morse [12], Leach [19]), в связи с чем культура Bac. oleraceae потеряла свой специфический интерес. И хотя гниль капусты, наряду с гнилью других растений, оставалась объектом изучения, выделяемые культуры относились к Bac. carotovorus. В СССР заболевание, аналогичное мягкой гнили, было описано Гордиенко [2] под названием слизистого бактериоза. Возбудителем заболевания, по исследованию автора, являлась бактерия, близкая к Bac. carotovorus. Кроме того, возбудители такого же бактериоза капусты были выделены и изучены Горленко и Воронкевич [3]. Авторы относят их к Bac. aroideae.

В свете изложенного материала представляется интересным привести данные, полученные нами при изучении бактерий, вызывающих мягкую гниль семенников капусты.

Происхождение и выделение культур

Материалом для выделения служили кочны и семенники капусты, имеющие различные поражения [8]. Образцы были получены нами на Грибовской селекционной станции и в колхозе Кунцевского р-на Московской области. Капуста была взята в различные сроки в поле, а также при хранении семенников в подвале. Данные по происхождению культур приведены в табл. 1.

Выделение и отбор культур для исследования производился следующим способом. Небольшой пораженный кусочек растирался в стерильной воде, после чего производился высев на поверхность МПА. Выделение культур производилось по возможности из всех типов колоний, выросших на чашках. Выделенные культуры подвергались в первую очередь испытанию в отношении способности вызывать гниль клубней картофеля [18] (рис. 1).

При выборе картофеля в качестве среды для проверки вирулентности мы исходили из данных об отсутствии специфичности у возбудителей мягкой гнили капусты и картофеля. При отдельных анализах мы

Таблица 1

Происхождение культур

№ культуры	Место взятия пробы	Стадия роста	Анализируемая часть растения	Характер поражения	Дата выделения
46	Грибовская селекционная станция, в поле	Капуста 1-го года Брауншвейгская (кочан)	Наружный лист у основания кочана	Гниль	11/X 1944
47	То же	То же	То же	»	11/X 1944
13	Колхоз Кунцевского р-на, в поле	Капуста 1-го года Амагер (кочан)	Наружный лист	Потемневшие сосуды	23/IX 1944
1	Совхоз Ленинские Горки, в поле	Стебли картофеля	Стебель	Почернение. «Черная ножка»	18/VII 1944
2	То же	То же	То же	То же	18/VII 1944
73	Грибовская селекционная станция, в поле	Капуста, сорт Белорусская (кочан)	Наружный лист	Гниль	11/X 1944
76	То же	То же	То же	То же	11/X 1944
77	»	»	»	»	11/X 1944
84	Колхоз Кунцевского р-на, в поле	Семенники	Центральная часть корня	»	11/X 1944
89	То же	То же	То же	»	11/X 1944
104	»	»	»	»	11/X 1944
253	Колхоз Кунцевского р-на, из подвала	»	»	»	11/X 1944
269	Там же, в поле	»	Побеги увядшие	Почерневшие сосуды	9/VI 1945
270	»	»	То же	То же	9/VI 1945
271	»	»	»	»	9/VI 1945

устанавливали патогенность вначале по капусте, а затем по картофелю. Однако нам не приходилось наблюдать культур, специфичных только по отношению к капусте. В связи с этим большинство культур было отобрано по способности вызывать загнивание картофеля и затем проверено по капусте. Из 300 выделенных культур было отобрано 52, обладающие способностью поражать клубни картофеля. Из них 15 культур были способны поражать капустные кочерыги. Все культуры были подвергнуты изучению, причем было установлено, что они различались между собой по отдельным физиологическим и культурным признакам. Более детальному изучению были подвергнуты культуры, поражающие капусту. Данные, характеризующие эти культуры, мы приводим в настоящей работе.

Результаты исследований

Патогенность

Патогенность культур испытывалась по отношению к клубням картофеля, корням моркови, к кочерыгам, к рассаде капусты и к всходам картофеля. Данные о характере поражения приведены в табл. 2. За

а

б

Рис. 1. Проверка вирулентности на клубнях картофеля и кочерыгах капусты. *а* — разрез клубней картофеля; *б* — разрез кочерыги капусты контрольной и зараженной. Через 4 дня после заражения (26°)

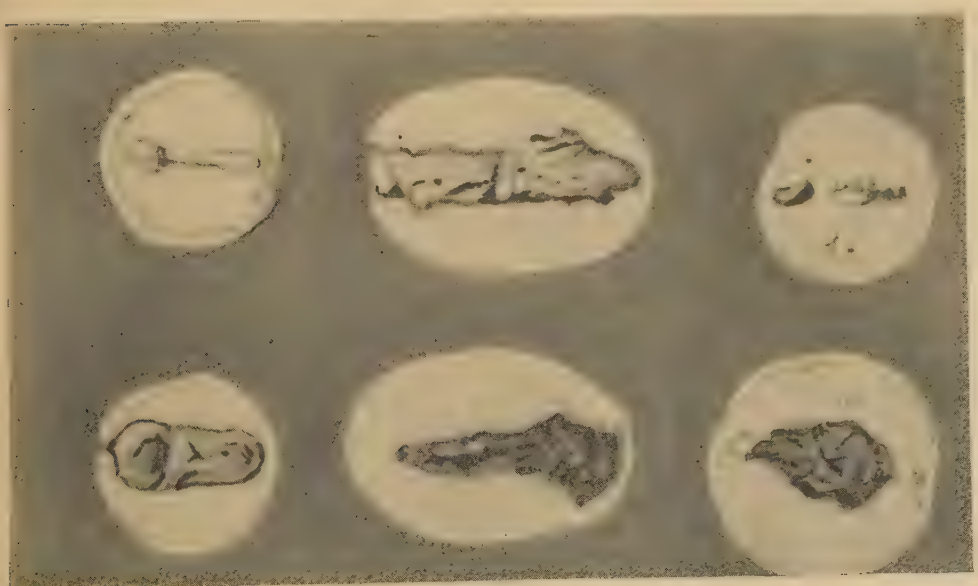

Рис. 2. Проверка вирулентности на ломтях моркови, картофеля и кочерыги капусты. По горизонтали: 1-й ряд культура № 104, 2-й ряд — культура № 47. По вертикали: 1-й ряд морковь, 2-й ряд картофель и 3-й ряд кочерыги капусты.

Таблица 2

Патогенность культур

№ культуры	К клубням и корням						К зеленому растению			
	картофеля		моркови		капусты		капусты		картофеля	
	характер поражения	степень	характер поражения	степень	характер поражения	степень	характер поражения	степень	характер поражения	степень
13	Мягкая гниль	5	Мягкая гниль	5	Мягкая гниль	5	Мягкая гниль	2	—	0
46	То же	4	То же	5	То же	4	То же	4	—	0
47	»	4	»	5	»	4	»	4	—	0
1	»	4	»	5	»	4	»	4	Почернение стебля	4
2	»	4	»	5	»	4	»	4		4
73	»	1	»	2	Небольшое углубление	1	—	—		
76	»	5	Небольшое углубление	1		3	Просветление около укола	1		
77	»	5	То же	2	То же	3	То же	1		
84	»	5	—	0	»	1	Мягкая гниль	3		
89	»	5	Небольшое углубление	1	»	3	Просветление около укола	2		
104	»	3	То же	1	»	1	То же	1		
253	»	2	»	1	»	3	»	1		
269	»	3	—	0	»	2	—	0		
270	»	1	Небольшое углубление	1	»	1	Просветление около укола	1		
271	»	3	—	0	»	2	Гибель всего растения	5	Почернение стебля	4

исключением культур №№ 84, 269 и 271, которые не поражали корней моркови, все выделенные культуры были способны вызывать поражение (мокрую гниль) корней картофеля, корней моркови и капусты (рис. 2). Полученные данные еще не позволяют произвести точно сравнение культур по степени патогенности к корням различных растений, но все же при поражении моркови и капусты по сравнению с другими можно отметить некоторое предпочтение культур №№ 1, 2, 13, 46, 47. При поражении клубней картофеля наиболее вирулентными показали себя культуры №№ 76, 77, 84, 89.

При заражении зеленого растения очень резко выделялась культура № 271, которая вызывала быструю гибель всего растения. Высокой вирулентностью, но несколько более низкой, чем № 271, обладали также культуры №№ 1, 13, 46 и 47.

Патогенность всех этих культур при хранении их в лабораторных условиях подвергалась значительным изменениям. Так, например, культура № 13, которая вначале вызывала интенсивную гниль картофеля и капусты, после хранения в лаборатории в течение года почти полностью потеряла способность поражать эти части растений. Между тем нам удавалось также и восстанавливать вирулентность при перевивке культуры на соответствующих частях растений.

Патогенность по отношению к зеленому растению не была также устойчивым признаком. Так, культура № 271, которая при выделении отличалась исключительной вирулентностью, через год уже утратила ее. Те же данные были получены и с культурами №№ 76, 77, 84, 89, 104, которые после года хранения на искусственных средах почти полностью потеряли способность заражать зеленое растение. Мы не имеем доста-

Морфолого-культуральные и биохими

№ культуры	Форма клетки	Размеры в μ	Подвижность	По Граму	Редукция NO_3	Гидролиз крахмала	Разжижение желатины	Образование индола	Форма колоний
1	Палочки	0,6 × 4,2	+	—	+	+	+	—	Белые, круглые, выпуклые, слизистые, иногда амебообразные
2	То же	0,6 × 3,4	+	—	+	+	+	—	То же
13	»	0,8 × 3,4	+	—	+	+	+	—	»
46	»	0,8 × 3,8	+	—	+	+	+	—	»
47	»	0,8 × 3,6	+	—	+	+	+	—	»
76	»	0,5 × 3,14	+	+	—	—	+	—	Белые, круглые, с неровными краями, иногда амебообразные
77	»	0,5 × 3,14	+	+—	—	—	+	—	То же
84	»	0,6 × 2,8	+	+	—	—	+	—	»
89	»	0,6 × 2,8	+	+-	—	—	+	—	»
104	»	0,5 × 2,4	+	—	—	—	+	—	»
269	»	0,5 × 2,7	+	—	—	—	+	—	»
270	»	0,5 × 3,14	+	—	—	—	+	—	»
271	»	0,5 2,6	+	—	—	—	+	—	»
73	»	0,5 × 2,5	+	—	+	—	—	—	Белые, круглые, флуоресценция
253	»	0,5 × 2,4	+	—	—	—	+	—	То же

Примечание: к — образование кислоты, кг — образование кислоты и газ,

точных данных для установления зависимости между степенью вирулентности на корнях и на зеленом растении.

Наши данные говорят о том, что поражение зеленого растения и корней может вызываться разными культурами. Культуры, выделенные из картофеля, больного «черной ножкой», поражают также клубни картофеля, корни моркови и капусту, но поражение зеленых проростков картофеля является их специфической особенностью, так как из остальных культур только культура № 271 вызывала такое поражение. Не было также совпадения в степени поражения рассады и кочерыг капусты. На основании этих данных можно сделать вывод, что культуры, поражающие капусту, хотя и не обладают специфичностью, но все же проявляют некоторое различие в степени вирулентности к различным растениям. Можно предполагать, что они не представляют исключения в этом отношении среди возбудителей мягкой гнили других растений.

По нашим исследованиям, в соответствии с литературными данными [16], все культуры способны образовывать ферменты, разрушающие пектиновые вещества. Вопросу о наличии этой способности у бактерий в связи с вирулентностью посвящена работа Шишеловой. Данные по этому вопросу будут приведены в специальном сообщении.

Морфологические и культуральные особенности

Многие свойства возбудителей мягкой гнили являются, как отмечает ряд авторов, очень непостоянными. В связи с этим при описании у различных авторов наблюдаются расхождения по целому ряду признаков.

Таблица 3

ческие особенности культур

Рост на МПА (штрих)	Рост на МПБ	Рост на картофеле	Молоко		Сбраживание углеводов						Оптимальная температура в градусах
			свертывание	пептонизация	глюкоза	сахароза	лактоза	мальтоза	маннит	глицерин	
Белый, блестящий, неровный	Слабая муть	Серовато-белый обильный рост с газообразованием	+	+	кг	кг	кг	кг	кг	кг (сл)	~35
То же	»	То же	+	+	кг	кг	кг	к	кг	кг	~35
»	»	»	+	+	кг	кг	кг	кг	кг	кг	~35
»	»	»	+	+	кг	кг	кг		к	—	~35
»	»	»	+	+	кг (сл)	кг (сл)	кг (сл)	кг (сл)	кг (сл)	кг (сл)	~35
Белый с желтоватым оттенком	Муть небольшая, тонкая, оседающая на дно пленка	Желтовато-белый гладкий налет	—	+	к~	к	—		к	к	~40
То же	То же	То же	—	+	к	к	—	—	—	к	~40
»	»	»	—	+	к	к	—	—	к	—	~40
»	»	»	—	+	к	к	—	—	—	—	~40
»	»	»	—	+	к	к	к	—	—	—	~40
»	»	»	—	+	к	—	—	—	к	к	~40
»	»	»	—	+	к	—	—	—	к	к	~40
»	»	»	—	+	к	к	—	—	—	—	~40
Белый налет, флуоресценция	Муть ровная	Небольшой налет белый	+	+	к	к	к	—	—	к	—
То же	То же	То же	—	+	к	к	—	—	к	к	—

кг (сл)—слабое образование кислоты и газа, — отсутствие кислоты и газа.

С целью установления однородности этой группы мы произвели подробное изучение выделенных культур. Результаты приведены в табл. 3.

Большинство признаков изучаемых культур совпадало с признаками, описанными для возбудителей гнили. Между тем некоторые из них отличались большой неустойчивостью (форма колоний, рост на твердых средах, окраска по Граму), а отдельные признаки (оптимальная и смертельная температура, спорообразование) совершенно не совпадали с данными, имеющимися в литературе. В связи с этим большое внимание было обращено на изучение этих признаков.

Отличительной особенностью большинства культур была исключительная изменчивость формы колоний. Так, культура № 13 и аналогичные ей по форме колоний культуры №№ 1, 2, 46 и 47 при выделении были описаны как имеющие круглые, сильно слизистые колонии. В дальнейшем они были отмечены как культуры, образующие колонии с извитыми краями, а затем — как культуры с амебообразными колониями.

Своеобразную форму колоний имела другая группа бактерий (№№ 76, 77, 84, 89, 104). В большинстве случаев они росли, образуя белые колонии с изрезанными краями, а иногда с большими отростками. Культуры №№ 73 и 253 давали колонии с флуоресценцией.

При культивировании на МПА культуры легко диссоциировали, при этом давали расы, различающиеся по размерам палочек, но с одинаковой степенью вирулентности к картофелю. Рост на наклонном МПА также очень изменялся в зависимости от частоты перевивок и продолжительности культивирования на этой среде.

При окраске по Граму были получены следующие данные: культуры №№ 1, 2, 13, 46, 47 вскоре после выделения были грамположительны, при повторной окраске через 1 год они были грамотрицательны. Остальные культуры красились неопределенно. В связи с этим становятся понятными расхождения у различных авторов при определении этого признака у Bac. carotovorus. Jones считает их грамположительными, Harding и Morse — грамотрицательными.

Еще более неопределенные данные были получены нами при исследовании культур в отношении способности их к спорообразованию. При обычных окрасках (метиленовой синью) препаратов, приготовленных из свежевыделенных односуточных культур на МПА, можно было наблюдать в большинстве случаев неокрашенные включения в клетках в виде спор. В одних культурах эти включения были крупные и клетки имели вид типичных клостридий, в других они были более мелкие, чем палочки, и обычно в небольшом количестве.

При продолжительном культивировании на МПА отдельные культуры теряли способность образовывать вышеописанные включения (их нельзя было обнаружить в препарате из культур в возрасте до 20 дней). Иногда при перевивках они появлялись вновь, но в настоящее время мы не имеем еще достаточных данных для определения условий, благоприятствующих их образованию (это явление в отношении спор описано в ряде работ: Мантейфель [5], Starkey [25]). В нашей работе оно должно явиться предметом специального исследования.

Наши данные пока ограничиваются результатами окраски препаратов и проверкой термоустойчивости клеток, а также сохранением вирулентности культур после нагревания.

Окраска препаратов фуксином по Ziel, как это рекомендуется для спор, дала отрицательный результат; включения при этом методе остались бесцветными. Они окрашивались по методу Пешкова [7] (окраска метиленовой синью по Лефлеру и нейтральротом) и по способу Клейна [6] (фуксином и метиленовой синью).

Результаты нагревания старых (18-дневных) и молодых (односуточных) культур при 80° 15 минут приведены в табл. 4.

Все культуры, за исключением № 73 и № 253, в которых мы не наблюдали никаких включений, являются теплоустойчивыми. Между отдельными культурами отмечается все же значительная разница. Четкое различие между устойчивостью 18-дневных и односуточных культур получено только у отдельных культур (№№ 13, 269, 271). Заражение ломтей картофеля культурами, подвергнутыми нагреванию, дало во всех случаях такое же поражение, как и заражение культурами без нагревания.

Полученные данные не позволяют еще сделать окончательных выводов; во всяком случае этот процесс имеет много особенностей и не укладывается в упрощенные представления о спорообразовании. При современном состоянии наших знаний о строении бактерий и, в частности, спор (Имшенецкий [4]) решение вопроса об образовании таковых возбудителями гнили приобретает особый теоретический и практический интерес. В связи с этим в настоящее время нами проводится более детальное изучение этого процесса. Таким образом, оставляя пока вопрос о спорах открытым, мы все-таки считаем возможным на основании изучения всех свойств сравнить эти культуры с описанными в литературе. Тем более, что Jones [15] при изучении культуры Bac. carotovorus наблюдал внутри клеток образования, напоминающие споры, а Harrison [13] при изучении культуры Bac. oleraceae обнаружил измененные булавовидные клетки. Однако после опытов с нагреванием этих культур Jones пришел к выводу, что это вакуоли, а Harrison считал булавовидные клетки за инволюционные формы.

Рост культур на МПА после нагревания при 80° 15 минут

Схема опыта		№ культур												
		47	13	46	1	76	77	104	89	84	271	269	270	73	253
Восемнадцатидневные культуры	Окраска по Пешкову .	Споры	Нет спор	Нет спор	Споры	Синие и желтые клетки	Споры	Споры	Синие и желтые клетки	Нет спор	Споры	Споры	Споры	Нет спор	Синие и желтые клетки
	До нагревания	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++		+++	+++
	После нагревания . .	+++	++	+−	+++	+++	+++	++	++	−	++	++		−	−
Однодневные культуры	До нагревания	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	После нагревания . .	+++	+−	++	++	++	++	+++	++	++	−	+−	+−	−	−

Примечание. Культуры №№ 1, 13, 46 и 47 — на бульоне, остальные со среды Тара.

Мы полагаем, что Jones и Harrison наблюдали в клетках то же явление, что и мы при исследовании выделенных нами культур.

При сравнении данных Morse [1] и Pain и Chaudhuri [22] можно отметить, что теплоустойчивость различных культур одного возбудителя гнили не одинакова. Так, смертельной температурой для культуры Bac. atrosepticus, по данным Morse, является температура 51—52°. Между тем, по исследованию Pain и Chaudhuri [22], выделенная ими культура того же названия погибала при 47°. Следовательно, границы теплоустойчивости этих культур не являются для них специфичными.

Физиологические признаки

Данные о физиологических особенностях культур приведены в табл. 3, из которой видно, что культуры проявляют большое разнообразие в отношении всех этих свойств. Одни из них вызывают редукцию нитратов, гидролиз крахмала, отчетливое свертывание и пептонизацию молока, сбраживание углеводов с образованием газа и кислоты. Другие — не редуцируют нитратов, не вызывают гидролиза крахмала, на молоке не образуют плотного сгустка, а дают только пептонизацию, на средах с углеводами дают слабое подкисление. Кроме того, имеются также культуры (№№ 73 и 253), которые отличаются от описанных флуоресценцией на агаре и рядом других признаков. Все эти культуры, за исключением №№ 73 и 253, представляют как бы переходные формы одного вида.

Заключение

Результаты проведенного нами изучения гнили семенников капусты показывают, что возбудителями этого заболевания могут являться бактерии различные по морфолого-культуральным особенностям.

Попытки идентифицировать их с описанными ранее возбудителями гнили овощных культур встретили большие трудности. Так, культура № 46 очень близко подходит по свойствам к культуре Bac. carotovorus, как она описана у Jones [15].

Культура № 47, выделенная из того же материала, отличается от последней по способности к образованию кислоты и газа на глицерине. Культуры № 1 и 2, выделенные из проростков картофеля, больных «черной ножкой», отличаются от культуры № 47 способностью заражать проростки картофеля.

Культуры № 104 и № 89 отличаются от № 47 по целому ряду свойств. В то же время они полностью совпадают по свойствам с культурой Bac. oleraceae Harrison [13], хранившейся в течение нескольких лет в коллекции института.

Необходимо отметить, что свойства нашей коллекционной культуры Bac. oleraceae не совпадают в этом отношении с данными Harrison [13].

Культуры №№ 104 и 89 могут быть также отнесены в равной мере и к Bac. aroideae, если считать, как это делает Massey [21], что характерным отличием последнего от Bac. carotovorus является образование на углеводах кислоты без газа.

На этих примерах мы видим, что характеристика таких видов фитопатогенных бактерий, как Bac. carotovorus, Bac. oleraceae, Bac. aroideae, не может считаться вполне определенной и отношение наших возбудителей к тому или иному виду трудно точно обосновать. О том же говорят данные различных авторов, полученные при сравнении выделенных ими возбудителей гнили с оригинальными. В одном случае они доказали их идентичность, в другом относили их к различным видам. Ряд исследователей (Harding and Morse [12], Leach [19], Bonde [9], Dow-

[1] Цит. по Бургвиц [1].

son [10]) объединяют выделенных ими различных по свойствам бактерий (возбудителей мягкой гнили) в один вид под названием Bac. carotovorus.

Мы также не находим целесообразным считать выделенных нами бактерий за самостоятельные виды, тем более, что они обладают общими характерными свойствами. Все они: 1) способны вызывать поражения одного и того же типа (мягкая гниль); 2) способны мацерировать ткани растений; 3) обладают высокой теплоустойчивостью; 4) обладают одинаковой формой колоний и дают одинаковый рост на твердых средах.

Учитывая к тому же исключительную, характерную для всех выделенных бактерий вариабильность свойств, мы считаем возможным объединить их под названием Bac. carotovorus.

Обращает на себя внимание близость подобных культур к сапрофитам, с которыми они имеют много общего. Только большинство из них близки, по нашему мнению, не к отдельным представителям группы coli-aerogenes, как говорят Elrod [11] и Stanley [23] о Bac. carotovorus, а скорее к споровым формам.

В отличие от специфических паразитов, как Bact. mori, Bac. malvacearum, способных поражать только один вид растения, обладающих устойчивыми признаками и т. п., возбудители гнили скорее могут быть отнесены к полупаразитам, являясь безусловно своеобразной группой фитопатогенных бактерий.

Выводы

1. Возбудители гнили капусты вызывают также гниль клубней картофеля и корней моркови, и большинство из них способно в разной степени поражать зеленое растение (рассада капусты).

2. Бактерии, обладающие способностью вызывать мягкую гниль капусты, различаются между собой по отдельным признакам.

3. Многие культуры по свойствам полностью соответствуют культуре, выделенной из стебля картофеля, больного «черной ножкой».

4. При культивировании на искусственных средах возбудители гнили характеризуются неустойчивостью своих морфолого-культуральных признаков (форма колоний и клетки, окраска по Граму, характер роста), а также и патогенности.

5. Идентификация возбудителей гнили крайне затруднительна в связи с вариабильностью их свойств. Однако большинство выделенных бактерий может быть условно отнесено к Bac. carotovorus Jones.

Московское отделение
Всесоюзного института
сельскохозяйственной микробиологии

Получено 15.II.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Бургвиц Г. К. Бактериальные болезни растений. Ленинград, 1936.
2. Гордиенко Ф. И. Природа и пути инфекции главнейших бактериозов капусты и обоснование способов борьбы с ними, стр. 27, 1940.
3. Горленко М. В. и Воронкевич И. В. Возбудитель слизистого бактериоза капусты. ДАН СССР, т. LII, № 9, стр. 815, 1946.
4. Имшенецкий А. А. Строение бактерий, Москва, 1940.
5. Мантейфель А. Я. Обзор литературы по вопросу о влиянии различных факторов на спорообразование у бактерий. Микробиология, т. IX, вып. I, стр. 16, 1940.
6. Омелянский В. Л. Практическое руководство по микробиологии, стр. 110, 1940.
7. Пешков М. А. К методике окраски спор у бактерий. Медицинский журнал. № 5—6, стр. 16, Иркутск, 1924.
8. Старыгина Л. П. и Шишелова Н. А. Бактериоз семенников капусты. Доклады ВАСХНИЛ, № 5, стр. 27, 1947.

9. Bonde R. Comparative studies of the bacteria associated with potato blackleg and seedpiece decay. Phytopathology, v. XXIX, N 10, p. 831, 1929.
10. Dowson W. J. Identity of the Bacterium causing potato blackleg. Nature, v. 145, No. 3668, p. 263, 1940.
11. Elrod R. P. The erwinia-coliform relationship. J. Bact., v. 44, No. 4, p. 433, 1942.
12. Harding H. A. and Morse W. J. The bacterial soft rots of certain vegetables. Part I. N. Y. Agr. Exp. Sta. Bull. Techn., No. 11, p. 251, 1909.
13. Harrison F. C. A bacterial disease of cauliflower (Brassica oleraceae) and allied plants. Ctbl. Bakt., Bd. 13, S. 44, 185, 1904.
14. Jennison. Цит. по Stanley. Physiologic and serologic studies of the soft rot and colon group of bacteria. Agr. Exp. Sta. Bull., No. 287, 1938.
15. Jones L. R. Bacillus carotovorus n. s. die Ursache einer weichen Fäulnis der Möhre. Ctbl. Bakt., II Abt., Bd. VII, S. 12, 61, 1901.
16. Jones L. R. Pectinase, the cytolytic enzime produced by Bacillus carotovorus and certain other soft rot organisms. Verm. Agr. Exp. Sta. Bull., No. 147, p. 281, 1909.
17. Lacey M. S. A soft rot of potato tuber due to Bacillus carotovorus and a comparison of the cultural pathological and serological behavior of various organisms causing soft rots. Ann. Appl. Biol., v. 13, p. 1, 1926.
18. Leach J. G. The relation of the seedcorn maggot to the spread and development of potato blackleg in Minnesota. Phytopathology, v. XVI, No. 3, p. 149, 1926.
19. Leach J. G. Blackleg diseases of potatoes in Minnesota. Techn. Bull., No. 75, Minn. Agr. Exp. Sta., 1931.
20. Link K. K. Цит. по Elrod. Serological studies of the Erwinia. The Botanical Gazette, v. 103, No. 2, p. 266, 1941.
21. Massey A. B. A study of Bacillus aroideae Townsend, the cause of a soft rot of tomato and B. carotovorus Jones. Phytopathology, v. 14, No. 10, p. 460, 1924.
22. Pain S. G. and Chaudhuri H. R. The blackleg diseases of the tomato on the relationship of Bacillus solanisaprus. Phytopathology, v. 13, No. 8, p. 358, 1923.
23. Stanley A. R. Physiologic and serologic studies of the soft rot and colon group of bacteria. Agr. Exp. Sta. Bull., No. 287, 1938.
24. Stapp C. Die Schwarzbeinigkeit und Knollennassfäule der Kartoffel. Arb. aus Biol. Reichs. Land. und Forst., 16, S. 643, 1928.
25. Starkey R. L. A study of spore formation and other morphological characteristic of vibrio desulfuricans. Arch. Mikrob., Bd. 9, Heft 3, S. 268, 1938.

БЫСТРЫЙ МЕТОД КОНТРОЛЯ НАД НАРАСТАНИЕМ ДРОЖЖЕВОЙ МАССЫ В ПРОЦЕССЕ БРОЖЕНИЯ

А. Э. Смирнова

Контроль над нарастанием дрожжевой массы является основным критерием хода процесса дрожжевого производства.

Точно зная, как идет накопление дрожжей, можно во-время принять меры при недостаточном росте их.

В настоящее время на дрожжевых заводах судят об интенсивности роста дрожжей в чане по количеству почкующихся клеток, а иногда — по количеству дрожжей, получаемых путем отсоса бродящей жидкости с дрожжами через бюхнеровскую воронку.

При этом первый из указанных выше методов не дает точных указаний о накоплении веса дрожжевой массы, второй метод сравнительно длительный, так как требует времени на отсос массы, а для получения более точных данных — поправки на влажность, которая еще более удлиняет выяснение окончательного результата. Поэтому данный метод не является оперативным, а лишь фиксирующим интенсивность роста дрожжей на определенном, уже пройденном пути их размножения.

Дьячковым [1] был предложен метод определения количества дрожжей по их объему, занимаемому в центрифужной градуированной пробирке. Этот метод нашел многих противников, так как не давал точных результатов вследствие трудности получения равномерного осадка.

В практике научно-исследовательских учреждений существует метод определения нарастания дрожжевой массы в процессе роста дрожжей, заключающийся в отсасывании определенной пробы бродящей жидкости через предварительно доведенные до постоянного веса фильтры Шотта № 4 и последующей сушке их до постоянного веса.

Обычно для вышеуказанных определений берут 25 или 50 мл бражки. При такой маленькой порции может сказаться небольшая неточность даже в калибровке пипетки.

Употребление бóльших количеств бражки не всегда технически возможно вследствие удлинения и без того продолжительного процесса отсасывания и доведения дрожжей до постоянного веса.

Этот метод благодаря своей длительности еще более, чем отсос через бюхнеровскую воронку, лишь фиксирует пройденный этап. Большая неточность получаемых результатов вообще делает его мало пригодным.

Ниже помещаем таблицу сравнения веса дрожжей, получаемых путем отсасывания через фильтр Шотта № 4, с одной стороны, с теоретическим содержанием дрожжей в данной взвеси — с другой.

Для получения сравнительных данных точная навеска прессованных дрожжей с известной влажностью разводилась в определенном объеме воды. Из полученной суспензии отбирали 25 мл, которые отсасывались через предварительно доведенный до постоянного веса фильтр Шотта № 4 и вместе с отфильтрованными дрожжами снова сушились до постоянного веса.

Таблица 1

Процент ошибки, получаемый при определении нарастания дрожжевой массы с помощью фильтров Шотта № 4

№ п/п.	Действительное содержание дрожжей при пересчете на сухое вещество (в 25 мл бражки) в г	Полученный вес осадка дрожжей в фильтре Шотта (из 25 мл бражки) в г	Процент ошибки
1	0,0318	0,0364	+14,4
2	0,0725	0,0829	+14,4
3	0,2010	0,2183	+ 8,6
4	0,0159	0,0170	+ 7,0
5	0,0445	0,0476	+ 6,9
6	0,0421	0,0450	+ 6,9
7	0,2175	0,2255	+ 3,7
8	0,0670	0,0692	+ 3,3
9	0,0670	0,0694	+ 3,3
10	0,0210	0,0216	+ 2,9
11	0,1455	0,1480	+ 1,7
12	0,0589	0,0590	+ 0,0
13	0,0842	0,0826	— 1,9
14	0,0469	0,0440	— 6,2
15	0,0335	0,0312	— 6,9
16	0,0636	0,0557	—12,4
17	0,0067	0,0058	—13,4
18	0,0084	0,0072	—14,2
19	0,0167	0,0142	—14,9

Как видно из прилагаемой таблицы, метод отбора проб через фильтр Шотта с целью суждения о нарастании дрожжевой массы является совершенно не точным.

Недостатки ранее перечисленных методов определения количества нарастаемых дрожжей натолкнули исследователей на совершенно оригинальный способ вычисления концентрации дрожжей в суспензии по их мутности при помощи нефелометра [2, 3, 4, 5, 6].

Авторы проверили свои методы на различных чистых растворах суспендированных в них культур дрожжей и бактерий при помощи различных конструкций нефелометров, большей частью довольно кустарных. Но довольно хлопотливая техника описанных методик, сложность расчетов по некоторым из них и несовершенство приборов оставили желать много лучшего.

Работая в этом направлении, мы применили фотоэлектрический нефелометр отечественного происхождения, выпущенный мастерскими Харьковского государственного института мер и измерительных приборов в начале 1941 г. (рис. 1).

Основными частями этого нефелометра являются: корпус осветителя *1*, представляющий собой шар, полость которого покрыта сернокислым барием, дающим равномерно рассеянный свет. Внутри корпуса помещена электролампа *2* с биспиральной нитью накаливания мощностью 70—72 ватта, напряжением 120 вольт.

К корпусу осветителя через патрубок *3* присоединены две трубы, расходящиеся под углом. Свет, излучаемый лампочкой, проходит через отверстие в корпусе осветителя и, разветвляясь в патрубке, попадает в трубы.

В каждой из труб расположены последовательно: конденсор (диоптрия 12, 75 или 13) *5* и *5′*, секторная диафрагма *6* и *6′*, кювета *7* и *7′*, конденсор (диоптрия 7 или 7,5) *8* и *8′*; фотоэлемент *9* и *9′*.

Секторная диафрагма правой трубы закреплена неподвижно, в то время как секторная диафрагма левой трубы, являясь подвижной, служит для компенсации фототоков, попадающих на фотоэлементы.

Подвижный сектор диафрагмы связан с вращающимся кольцом, на поверхности которого нанесены деления, соответствующие градусам. Для получения более точных данных имеется шкала нониуса. Кювета левой трубы заполняется испытуемой жидкостью, кювета правой трубы заполняется чистой водой. Фотоэлементы для труб подбираются попарно по ряду показателей.

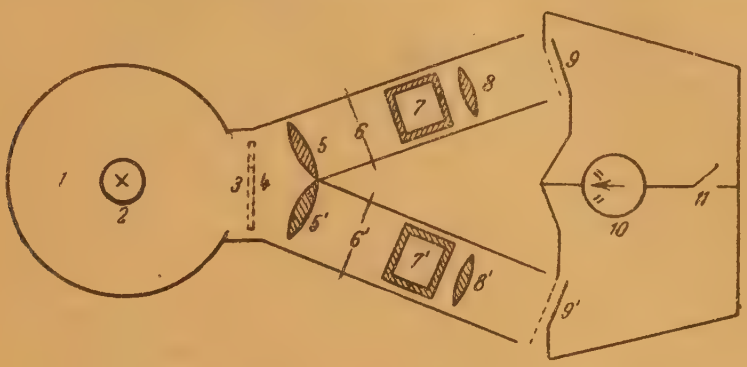

Рис. 1. Схема абсорбциометра

При регулировании светового потока секторной диафрагмы для суждения о равенстве фототоков на фотоэлементах пользуются гальванометром, который включается с помощью переключателя. Во время работы нефелометра гальванометр все время держат выключенным и включают лишь на один момент, во избежание порчи его.

Для работы с нефелометром последовательно соединяют фотоэлементы, включив между ними гальванометр и переключатель. Перед работой производят холостое определение с целью проверки работы фотоэлементов. При кюветах, одинаково заполненных чистой водой, показания на шкале подвижной диафрагмы должны быть близки к 0°. С помощью нониуса точно отмечаются показатели холостого определения. Со временем, вследствие усталости фотоэлементов, эти показатели очень медленно будут расти. Но для исследователя это явится важным сигналом для проверки выработанной им шкалы, о которой речь будет ниже.

Для определения мутности раствора в правую кювету наливают воду, а левую доверху наполняют испытуемым раствором, кюветы закрывают имеющимися при них крышечками, а затем отверстие в нефелометре для вставки кювет тщательно закрывают, включают лампу, и с помощью подвижной секторной диафрагмы и гальванометра производится компенсация фототоков.

Делают отсчет полученных градусов, которые затем пересчитываются по составленной исследователем шкале. Обычно делается несколько отсчетов. С целью получения более правильных данных нужно производить отсчеты как можно быстрее, особено, если имеются быстро оседающие дрожжи. При хорошо подобранных фотоэлементах и аккуратной работе с прибором можно пользоваться шкалой без проверки не менее 6 месяцев.

Все определение мутности раствора совместно с вычислением результатов отнимает около 3 минут.

С целью проверки правильности получающихся результатов нами был пронефелометрирован ряд концентраций дрожжей из разных партий выработки с разной влажностью дрожжей.

Точная навеска дрожжей с предварительно определенной влажностью разводилась в мерной колбе так, чтобы получились разведения 0,1; 0,2; 0,3% и т. д. до 1, а затем до 2 и 3%.

Результаты показания нефелометра сведены в табл. 2.

Таблица 2

Зависимость между концентрацией дрожжей и показаниями нефелометра

Концентрация дрожжей в %	Показания нефелометра в градусах		
	Образец № 1 (содержание сухих веществ 31,60%)	Образец № 2 (содержание сухих веществ 27,90%)	Образец № 3 (содержание сухих веществ 25,45%)
0,1	4,9	4,0	3,5
0,2	9,8	8,0	6,0
0,3	15,0	12,0	10,0
0,4	20,0	16,0	14,0
0,5	25,0	21,0	18,0
0,6	31,0	25,0	21,0
0,7	36,0	28,0	26,0
0,8	39,0	32,0	29,0
0,9	44,0	36,0	34,0
1,0	47,0	40,0	36,0
1,5	—	56,0	—
2,0	78,0	68,0	68,0
3,0	112,0	102,0	109,0

Как видно из представленного материала, во всех проведенных опытах наблюдалась сравнительно точная пропорциональность между разведениями дрожжей при концентрациях в пределах до 1%.

При концентрациях дрожжей в растворе свыше 1% мы не нашли зависимости между концентрацией дрожжей и показаниями нефелометра и считаем необходимым прибегнуть к разведению дрожжей с учетом последнего при расчете.

На основании проведенных нами многочисленных разведений дрожжей с известным количеством сухих веществ было выведено, что 1° шкалы для нашего нефелометра на тот период времени, когда велась с ним работа при показателях в пределах 50°, равен 0,00673 г абсолютно сухого вещества дрожжей.

Затем эти данные были проверены на дрожжевых суспензиях, взятых во время выращивания дрожжей. Параллельно, с целью контроля, центрифугировался 1 л бражки с дрожжами; в выделенных дрожжах определялись общий вес и влажность.

Таблица 3

Сравнение данных по определению количества дрожжей в бражке с помощью нефелометра и центрифугирования (в граммах)

Количество дрожжей по нефелометру в пересчете на сухой вес	Количество отцентрифугированных дрожжей в пересчете на сухой вес	Процент ошибки
2,71	2,73	— 0,7
3,89	3,85	+ 1,0
5,13	5,06	+ 0,9
5,96	5,91	+ 0,8
6,44	6,53	— 1,4

Для суждения об относительной интенсивности накопления дрожжей в процессе их роста такой процент ошибки не играет роли. Одновременно быстрота проведения анализа и несложность его дают возможность при пользовании нефелометрическим определением оперативно судить о ходе процесса накопления дрожжевой массы.

Следует оговориться, что точность результатов зависит от степени осветления приточного сусла.

Со своей стороны считаем необходимым отметить, что описанная конструкция нефелометра имела большое число недостатков, которые создавали для работника много неудобств.

С помощью описанной, сравнительно примитивной конструкции нефелометра мы только лишний раз хотели подтвердить, что суждение о накоплении дрожжевой массы в процессе ее роста на основании мутности бражки в принципе является правильным, а само выполнение методики — быстрым, оперативным и применимым не только в условиях научно-исследовательской работы, но также и для практических целей на заводе.

Выводы

1. Мутность бражки является относительным показателем концентрации дрожжей.

2. Описанная методика определения концентрации дрожжей с помощью фотоэлектрического нефелометра дает возможность судить об интенсивности накопления дрожжей в бражке в процессе их роста.

Научно-исследовательский институт
бродильной промышленности
Министерства вкусовой промышленности РСФСР
Москва

Получено 27.V.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Дьячков Г. С. Экспрессный метод количественного определения дрожжей в продуктах брожения торфяного отжима. Микробиология, т. X, вып. 6, стр. 771, 1941
2. Awtonomowa E. S. and Stessel T. A. Nephelometrische Methode zur Bestimmung der Anzahl der Mikrobenleiber in bakteriellen Suspensionen mit Hilfe einer Photozelle. Biochem. Z., Bd. 274, S. 220, 1934.
3. Enders C. und Kärnbach K. Hefemessung mit dem Lange-Kolorimeter. Wochenschr. Brauer., Bd. 44, S. 185, 1937.
4. Medwedew G. und Schelaumowa A. Über die Anwendung des Nephelometers bei Untersuchungen an Hefen. Biochem. Z., Bd. 289, S. 52, 1936.
5. Munter S. Über Bakterienzählung und-grossenmessung in Aufschwemmungen (insbesondere Vaccinen) mittels des Kleinmannschen Nephelometers. Z. Hyg. und Infektionskrankheiten, Bd. 106, H. 1, S. 50, 1926.
6. Williams R. I., Mc. Alister E. D. and Roehm R. R. A rapid and accurate method for determining the quantity of yeast or other microorganisms in a suspension. J. Biol. Chem., v. 83, p. 315, 1929.

О ПРИРОДЕ БАКТЕРИОФАГА

II. ОЧИЩЕННЫЙ БАКТЕРИОФАГ И ЕГО СВОЙСТВА

А. Е. Крисс и Е. А. Рукина

Среди различных путей в исследованиях природы бактериофага решающим надо признать такое направление, которое не ограничивается поисками косвенных доказательств в пользу той или иной точки зрения на сущность бактериофагии, а осуществляет определенными методами прямое разрешение этой задачи. На современном уровне состояния вопроса о бактериофаге, после того как перебраны всевозможные объекты для идентификации с ними фага (заметим, что некоторые из этих объектов менее изучены, чем бактериофаг), особо отчетливо выступает необходимость химической характеристики бактериофага для полного суждения о природе его. Анализ огромного фактического материала о бактериофаге, накопленного к настоящему времени, убеждает в том, что именно эта область исследований не достигла еще такой степени развития, которая была бы пропорциональна ее значению: число работ, непосредственно посвященных очистке и изучению состава бактериофага, сравнительно невелико.

Но в этих работах нельзя признать удовлетворительными применявшиеся методы очистки бактериофага. Многие из них не только не способствовали накоплению достаточного для анализа количества корпускул фага, а, наоборот, сильно уменьшали его концентрацию в конечных препаратах, что вызывало сомнение в достоверности полученных данных о составе бактериофага. Другие методы, как, например, в работах Schlesinger [12], Northrop [10], Kalmanson и Bronfenbrenner [6], по своей сути не обеспечивали возможности более или менее полной очистки фага от примесей, находившихся в фаголизате [1].

Недавно вышедшая работа Hook и др. [5] лишний раз подчеркивает, какое существенное значение имеют методы очистки для решения вопроса о химической конституции бактериофага. Авторы очищали путем центрифугирования тот же бактериофаг, каким пользовались Kalmanson и Bronfenbrenner [6],— фаг кишечной палочки P. C. Они вначале центрифугировали фаголизат при малом количестве оборотов для удаления бактериальных тел и их остатков, затем осаждали фаг на центрифуге Sharples, после чего концентрировали его в вакуум-ультрацентрифуге. Эти препараты были менее активны, чем очищенный фаг Kalmanson и Bronfenbrenner, однако содержали значительное количество нуклеиновых кислот и нейтральный жир. Напомним, что в концентратах, полученных Kalmanson и Bronfenbrenner более совершенным методом, фосфор составлял 0,07%, а жиры и углеводы отсутствовали.

Hook и др., несомненно, анализировали мало очищенные фаголизаты, в которых, помимо бактериофага, находились и продукты распада бактериальных клеток, осаждающиеся с такой же скоростью, как и бактериофаг. Гомодисперсный характер седиментационных диаграмм позволяет судить лишь об однозначности молекулярных весов веществ, составлявших осадки, а отнюдь не об их однородности.

[1] См. статью А. Е. Крисс «Энзимная природа бактериофага» [3].

Сравнительные определения, проведенные Taylor [14], показывают, что по химическому составу осадки из фаголизатов кишечной палочки очень мало отличались от осадков нелизированных клеток той же культуры.

Разработанный адсорбционный метод очистки бактериофага с помощью асканита (Крисс [2]) обеспечивал возможность фракционированного разделения фага и сопровождающих его в фаголизате большого числа азотистых примесей. Однако эту очистку бактериофага нельзя было признать полной, учитывая, что в процессе элюирования его из асканита в фильтрат вместе с частицами фага переходили хромогенные вещества асканита, бульона, а также соли.

Отделить хромогенные вещества из «асканитного» элюата фага и осуществить, таким образом, последующую очистку бактериофага удалось благодаря применению норита.

Было подмечено при изучении адсорбирующих свойств различных веществ по отношению к бактериофагу, что норит обесцвечивает бульонные фаголизаты и вместе с тем извлекает из них значительное количество фаговых корпускул. Опыты с норитом подтвердили данные Poorter и Maisin [11], Seiffert [13] и Klieneberger [8] о способности животного угля адсорбировать бактериофаг.

Изучение условий адсорбционного поглощения фага норитом выявило некоторые закономерности, которые имели определенное значение для целей очистки бактериофага. Выяснилось, например, явное несоответствие между степенью окраски фильтратов и содержанием в них фаговых частиц. При сравнительно высоком титре фага окраска фильтратов уступала бульону и в особенности асканитному элюату бактериофага.

Бóльшая адсорбционная способность хромогенных веществ асканитного элюата, чем заключенного в нем бактериофага, была использована. Путем распыления норита тонким слоем на поверхности колонки из мелкого кварцевого песка удалось добиться полного поглощения красящих веществ из асканитного элюата без ущерба для концентрации бактериофага. Благодаря использованию норита, метод фракционированного разделения бактериофага и примесей получил дальнейшее развитие. Однако здесь в отличие от асканита, где элюирующими средствами служили растворы солей с различными значениями pH, элюция бактериофага происходила путем вытеснения его веществами с большей адсорбционной способностью — явление, хорошо знакомое работавшим по очистке пигментов методом хроматографической адсорбции Цвета [4]. «Норитный» элюат бактериофага, свободный от красящих веществ, представлял собой более очищенный препарат фага, но вместе с тем сохранял все то количество солей, которые содержались в асканитном элюате.

Очистка норитного элюата от солей была произведена с помощью мела. Совершенно неожиданным и новым фактом явилась способность мела к адсорбции бактериофага. Адсорбционная емкость мела очень велика, но при одинаковом субстрате фага она колеблется в зависимости от качества адсорбента — степени очистки и дисперсности частиц мела.

Элюирование бактериофага из меловых адсорбционных комплексов легко достигается применением этилового спирта в смеси с серным эфиром, изоамиловым спиртом, сапонином, глюкозой. Из числа испытанных элюирующих средств наиболее подходящей оказалась смесь этилового спирта и серного эфира, поскольку эти растворители легко затем удалить из элюата отгонкой.

На рисунке изображена вся схема очистки бактериофага методом фракционированной элюции. Каждая ступень в ряду последовательно

сменяющих друг друга адсорбционно-элюационных методик являлась определенным шагом вперед в деле фракционирования бактериофага. На асканите оказалось возможным раздельное элюирование бактериофага и значительной части азотистых примесей белкового характера. Норит позволил отделить хромогенную фракцию. Адсорбирующие

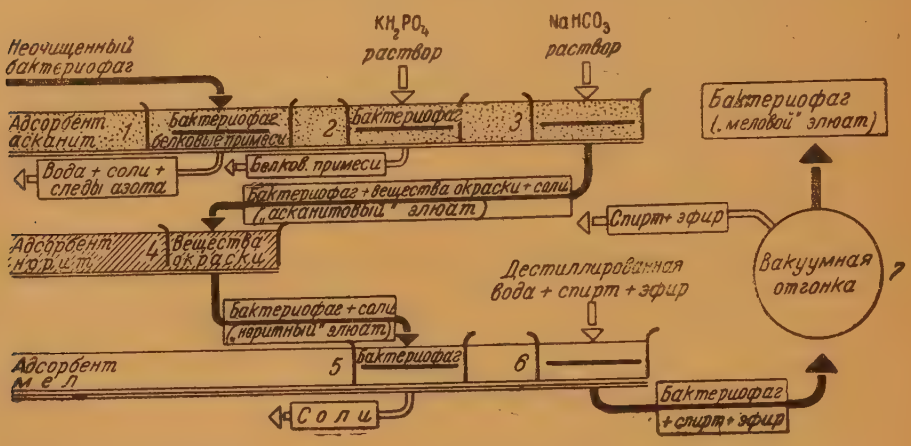

Рис. 1. Схема очистки бактериофага методом фракционированной элюции

свойства мела способствовали решению задачи удаления солей. Конечный результат — получение высокой концентрации бактериофага в дистиллированной воде.

Для суждения о наличии белка в очищенных препаратах бактериофага были применены серологический и химический методы.

Судьба бактериальных антигенов в процессе очистки

Из известных серологических методов была выбрана реакция связывания комплемента, позволяющая, благодаря своей высокой специфичности, улавливать ничтожно малые количества антигенов. В этом отношении она превосходит реакции агглютинации и преципитации.

Реакция связывания комплемента была проведена в модификации Иоффе, которая дает возможность обеспечить оптимальный и достаточно продолжительный контакт основных ингредиентов до прибавления к ним гемолитической системы. Как известно, Иоффе [1] рекомендует выдерживать смесь, состоящую из антигена, иммунной сыворотки (амбоцептора) и комплемента, 20 часов при 0° прежде, чем к ней добавлять гемолитическую систему, привлекающую к себе комплемент в случае, если он не связывается посредством амбоцептора с антигеном.

Постановке основных опытов предшествовала следующая подготовительная работа. Необходимо было подобрать бактериофаг достаточно высокого титра к культуре бактерий, продукты распада которой должны были явиться антигеном, и, с другой стороны, получить высоко специфичную иммунную сыворотку, реагирующую в больших разведениях с антигеном.

В качестве антигена была выбрана тифозная палочка. Ею иммунизировались кролики до появления максимально возможного титра антител в сыворотке крови. Полученные иммунные тифозные сыворотки имели комплемент — связывающий титр 1 : 1 600. К этой же культуре из сточной жидкости был выделен бактериофаг, который усиливался на ней путем последовательных пассажей по общепринятой методике.

После 12 пассажей выделенный бактериофаг лизировал тифозную палочку в разведении 10^{-8} без появления вторичного роста в течение 5 дней наблюдений.

Фаголизат тифозной палочки был очищен методом фракционированной элюции. Все фракции — неочищенный тифозный бактериофаг, фильтрат из-под асканита, элюат азотистых примесей (раствор KH_2PO_4), асканитный элюат, норитный элюат, фильтрат норитного элюата из-под меловой колонки, меловой элюат — служили антигенами, причем антигенные свойства каждой из фракций испытывались в серии последовательных разведений, кратных 4; конечное разведение антигенов составляло 1 : 10 240. Контролем в качестве антигена применялся неочищенный стрептококковый бактериофаг.

Предварительным этапом до решающего опыта явилось титрование комплемента. Следовало установить, какие дозы его связываются антигеном вне присутствия амбоцептора — иммунной тифозной сыворотки, т. е. не дают гемолиза красных кровяных шариков при прибавлении гемолитической системы.

Выяснилось, что все антигенные фракции связывают определенную дозу комплемента, вызывая частичную или полную задержку гемолиза. Особенно активно поглощал комплемент элюат азотистых примесей. На основании полученных данных были выбраны рабочие дозы комплемента, превышающие те дозы, которые еще связывались в какой-то мере соответствующим разведением антигенов.

К различным разведениям антигенов, которыми являлись фракции, полученные на всех ступенях очистки фаголизата тифозной палочки методом фракционированной элюции, добавлялась иммунная тифозная сыворотка (амбоцептор) в разведении 1 : 20 и 1,1, 5,2, 2,5 единицы комплемента. В 1-м контроле вместо тифозной сыворотки применялась иммунная стрептококковая сыворотка, 2-й контроль состоял из антигенов+комплемент без сыворотки, 3-й контроль имел в качестве антигена иммунную тифозную сыворотку, к которой прибавлялись применявшиеся дозы комплемента. Все смеси — опытные и контрольные — выдерживались при 0° в течение 20 часов, а затем к ним приливалась гемолитическая система. Пробирки с полным набором ингредиентов устанавливались в термостате при 37°. Регистрация результатов опытов проводилась через 3 часа и для окончательного суждения — через 20 часов.

Данные этого опыта приведены в табл. 1.

Оказалось, что профильтрованный через свечу Шамберлена фаголизат тифозной палочки содержит бактериальные антигены, которые улавливаются реакцией связывания комплемента не только в неразведенном фаголизате, но и в разведении его 1 : 640; следовательно, находятся в достаточно высокой концентрации.

Эти продукты фаголизиса, сохранившие свою антигенную природу, полностью адсорбируются на асканите и освобождаются из адсорбционной связи целиком, в результате промывания асканитного адсорбционного комплекса насыщенным раствором фосфата калия. В элюате азотистых примесей антигены тифозной палочки уловлены почти в том же разведении, как и в неочищенном тифозном бактериофаге.

Во всех последующих фракциях — асканитном, норитном и меловом элюатах — бактериальные антигены не были обнаружены даже в виде следов. Эти фракции и без разведения отклоняли комплемент, благодаря чему наступал резко выраженный гемолиз эритроцитов.

Примененный серологический метод Борде — Жангу позволил установить, что еще в первой стадии очистки бактериофага последний освобождается от белковых и других компонентов клетки, обладающих антигенным действием. Уже асканитный элюат содержит бактериофаг, свободный от продуктов обмена и фаголизиса бактериальной клетки, принадлежащих к числу высокомолекулярных соединений, способных вызывать иммунизаторный эффект при введении их животному.

Содержание общего азота в очищенном бактериофаге

Более полное суждение о степени чистоты получаемых препаратов бактериофага на различных этапах очистки методом фракционированной элюции и примерная характеристика очищенного фага были составлены на основании данных химического анализа.

Вначале на небольших количествах, до 1—2 л, удалось установить, что ничтожные количества общего азота можно открыть и в норитном элюате, тогда как в 8 опытах из 11 меловой элюат не содержал азотистых веществ. Однако сухие остатки после упаривания жидкости в

Таблица 1

Судьба бактериальных антигенов в процессе очистки бактериофага методом фракционированной элюции

Антиген	Разведение	Иммунная тифозная сыворотка в разведении 1 : 20				Иммунная стрептококковая сыворотка в разведении 1 : 20				Контроль антигена		
		Комплемент										
		1 Е	1,5 Е	2 Е	2,5 Е	1 Е	1,5 Е	2 Е	2,5 Е	1 Е	1,5 Е	2 Е
Неочищенный тифозный бактериофаг	б/р	++++	++++	++	++	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10	++++	++++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 40	+++	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 160	++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 640	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 2 560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10 240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Фильтрат из-под асканита	б/р	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 2 560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10 240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Элюат азотистых примесей (раствор KH_2PO_4)	б/р	++++	++++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 40	+++	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 160	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 640	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 2 560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10 240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Асканитный элюат												
Норитный элюат	б/р	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Фильтрат норитного элюата из-под меловой колонки	1 : 40	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 640	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 2 560	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	1 : 10 240	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Меловой элюат												
Тифозная сыворотка		—	—	—		—	—	—				

Примечание: ++++ полная задержка гемолиза; +++, ++, + различные степени неполной задержки гемолиза; — гемолиз.

этих опытах были практически недоступны для взвешивания, и поэтому оказалось невозможным определить процентное отношение азота к сухому веществу меловых элюатов. Поскольку в трех опытах общий азот в конечных препаратах обнаруживался, хотя и в виде следов, возникали сомнения насчет достоверности результатов отрицательных опытов.

Для окончательного решения вопроса требовались большие объемы фаголизата, чтобы получить достаточную для анализа массу вещества очищенного бактериофага. Удалось провести 2 таких опыта: 1-й с 35 л, 2-й с 40 л фаголизата.

Фильтрация жидкости через адсорбенты производилась в 50-литровых воронках Нуча. В обоих опытах после пропускания фаголизата через асканит последний промывался 20 л насыщенного раствора KH_2PO_4, а для элюирования бактериофага из асканитного адсорбционного комплекса применялось по 40 л 30% раствора $NaHCO_3$. Асканитные элюаты фильтровались сквозь 0,5—0,8-миллиметровый слой норита, распределенного по поверхности кварцевого песка, а норитные элюаты через мел (было взято для колонок по 1 кг мела — creta interna). Элюция бактериофага из меловых адсорбционных комплексов была произведена в 1-м опыте 4 л, а во 2-м — 5 л смеси, состоящей из бидестиллата, 250 мл серного эфира и 250 мл этилового спирта. Из меловых элюатов тотчас же после получения их отбиралось несколько миллилитров — в них определялся титр бактериофага. Весь объем меловых элюатов упаривался до 250—200 мл. Дальнейшая концентрация, до полного высушивания, осуществлялась в условиях вакуума.

Количественное определение общего азота производилось микрометодом Кьельдаля — анализировались от 100 до 500 мл полученных фракций, сухое вещество сжигалось целиксм. Белок определялся биуретовой, милоновой и ксантопротеиновой реакциями, титр бактериофага — методом Аппельмана с регистрацией результатов через 6 часов.

Данные этих опытов приведены в табл. 2 (см. стр. 182).

Титры фаголизатов дизентерийной палочки Шига равнялись 10^{10} в 1 мл. Количество общего азота в них составляло 4,7 г в 1-м опыте, во 2-м — 5,1 г на весь объем жидкостей. После 1-го этапа очистки — фракционирования на асканите — содержание азотистых веществ в очищенном бактериофаге значительно уменьшилось. В фильтрат ушло 483 и, соответственно, 528 мг общего азота; 3 860 мг в одном опыте и 4 340 мг в другом вымылись раствором фосфата калия. В асканитных элюатах осталось 168 и 152 мг общего азота.

Фильтрация через норит привела к дальнейшему снижению количества общего азота. 120 мг resp. 88 мг адсорбировались на норите; в норитных элюатах оказалось 48 и 64 мг азота.

В конечных препаратах — сухих остатках из меловых элюатов — было определено 0,3 и 0,2 мг общего азота; следовательно, при адсорбции бактериофага на мелу вместе с солями удаляется какое-то количество азота норитного элюата, а другая часть, адсорбировавшаяся мелом, не элюируется смесью эфира со спиртом.

Вес сухого вещества в меловых элюатах составлял 4,5 и 3,8 мг. Если исходить из объемов фаголизатов, взятых для опытов, то в одном опыте на литр их приходится 0,13 мг, в другом — 0,095 мг активной субстанции, т. е. меньше, чем в препаратах Kalmanson и Bronfenbrenner и Northrop; у первых авторов сухое вещество в пересчете на 1 л весило 0,36—0,6 мг; Northrop получал в среднем около 1 мг из литра фаголизата. Соответственно вес одного корпускула равнялся в первом опыте $1{,}13 \cdot 10^{-14}$ мг, во втором — $7{,}6 \cdot 10^{-15}$. По данным Kalmanson и Bronfenbrenner, вес корпускулов фага колебался в пределах от $1{,}4 \cdot 10^{-13}$ до $5{,}07 \cdot 10^{-14}$.

На одну частицу бактериофага, очищенного методом фракционированной элюции, приходилось азота $7{,}5 \cdot 10^{-16}$ мг и $4{,}0 \cdot 10^{-10}$ мг, тогда как у Kalmanson и Bronfenbrenner в концентрате бактериофага на ультрафильтре оставалось азота в расчете на 1 корпускул фага $7{,}0 \cdot 10^{-15}$ мг.

Таблица 2

Сравнительное определение белка и общего азота в препаратах бактериофага на всех этапах очистки методом фракционированной элюции

Исследованный объект	Количество в л	Титр фага в 1 мл	Пересчет фага на весь объем	Количество азота в 100 мл в мг	Пересчет азота в мг на весь объем	Вес сухого вещества в мг	Пересчет азота в % к сухому веществу	Реакция на белок		
								биуретовая	милоновая	ксантопротеиновая
Бульонный фаголизат	35	10^{10}	$3{,}5 \cdot 10^{14}$	13,4	4690			+	+	+
	40	10^{10}	$4 \cdot 10^{14}$	12,78	5112			+	+	+
Фильтрат	35	—	—	1,38	483			—	—	—
	40	—	—	1,32	528			—	—	—
Элюат азотистых примесей (раствор KH_2PO_4)	20	—	—	19,3	3860			+	+	+
	20	—	—	21,7	4340			+	+	+
Асканитный элюат	40	10^{10}	$4 \cdot 10^{14}$	0,42	168			—	—	—
	40	10^{10}	$4 \cdot 10^{14}$	0,38	152			—	—	—
Норитный элюат	40	10^{10}	$4 \cdot 10^{14}$	0,12	48			—	—	—
	40	10^{10}	$4 \cdot 10^{14}$	0,16	64			—	—	—
Фильтрат из-под меловой колонки	40	—	—					—	—	—
	40	—	—					—	—	—
Меловой элюат	4	10^{11}	$4 \cdot 10^{14}$					—	—	—
	5	10^{11}	$5 \cdot 10^{14}$					—	—	—
Концентрат мелового элюата	0,25	—	—					—	—	—
	0,20	—	—					—	—	—
Высушенный меловой элюат		—	—		0,3	4,5	6,6	—	—	—
		—	—		0,2 (в сух. вещ.)	3,8	5,3	—	—	—

Примечание: + положительная реакция; — отрицательная реакция.

Фракционированная элюция как метод очистки бактериофага позволяет получать более очищенные препараты, чем фракционированная ультрафильтрация. Преимущества метода фракционированной элюции — в последовательном удалении без ущерба для литических свойств фага веществ, находящихся с ним в сравнительно прочной связи, но отличающихся иной адсорбционной способностью. В этом убеждает не только сопоставление весовых количеств сухого вещества, но и содержание общего азота в очищенном бактериофаге. Процентное отношение азота в сухих остатках из меловых элюатов составляло 6,6 и 5,3%.

Вряд ли возможно считать эти величины предельными, отражающими результат полной очистки бактериофага, но столь малый процент общего азота, отрицательные реакции на белок приводят к заключению о небелковой природе тех молекулярных группировок корпускула бактериофага, которые определяют его литические свойства.

Литические группы, свободные от белка, способны вступать в связь с определенным субстратом бактериальной клетки, что в конечном

результате приводит к воспроизведению частиц бактериофага. Об этом можно судить по опытам с титрованием меловых элюатов. По мере разведения их в титрационном ряду число частиц очищенных фагов убывает кратно 10. В крайние разведения, особенно в последнее, попадают единичные корпускулы бактериофага. Между тем в пробирке с разведением 10^{-10}, где число корпускул не меньше единицы и не больше 10, после внесения капли суспензии бактерий, через $1^1/_2$—2 часа, наступает заметное помутнение бульона за счет размножающихся бактериальных клеток, а через 5 часов лизис миллионов бактерий развившейся популяции. Достаточно протитровать фаголизат из этой пробирки, чтобы убедиться в том, что одновременно с размножением и лизисом бактерий произошло накопление бактериофага — титр последнего в таких опытах равнялся 10^7 — 10^8. Полное восстановление титра до исходной концентрации удавалось после 2—3 пассажей по обычной методике. Следовательно, очищенный бактериофаг (меловой элюат) не теряет основных своих свойств—способности к лизису и воспроизведению.

Специфичность очищенного бактериофага

После того как было установлено, что меловой элюат не только обладает способностью лизировать гомологичную культуру, но при этом происходит репродукция корпускул бактериофага, возник вопрос, не теряется ли в результате очистки бактериофага специфичность его действия или, иными словами, возможен ли бактериолиз гетерогенных видов бактерий очищенным фагом. Удаление в процессе очистки специфических элементов бактериальной клетки и белковых веществ, возможно являющихся компонентами фаговой частицы, давало известные основания для предположений, что последний этап фракционирования бактериофага приведет к полной или частичной потере его специфичности. Этому вопросу была посвящена следующая серия исследований.

Методом фракционированной элюции были очищены бульонные фаголизаты кишечной палочки, палочки крысиного тифа, тифозной палочки и палочки дизентерии Флекснера. Каждый из очищенных бактериофагов (меловые элюаты) испытывался на литическое действие в отношении гомологичных культур (контроль) и кишечной, тифозной, дизентерийной, синегнойной палочек, палочки крысиного тифа, стафилококка, стрептококка и протея. Литическое действие очищенных бактериофагов во всех опытах определялось капельным методом на плотной среде.

В табл. 3 даны результаты проведенных экспериментов. Очищенные бактериофаги (меловые элюаты) лизировали только гомологичные культуры бактерий, из которых были получены фаголизаты, послужившие материалом для очистки. Близкие виды из кишечно-тифозной группы оказались нечувствительными к очищенным фагам, не говоря уже о кокках и других бактериальных формах. По следу капли элюатов не обнаруживались даже одиночные стерильные пятна [2], что указывает на полное отсутствие фагосенсибильных особей среди миллионов клеток бактериальных культур. Повидимому, специфичность действия бактериофагов определяется не теми веществами, которые отделяются в процессе очистки, а обусловлена характерными особенностями молекулярных группировок корпускула фага, ответственных за его лизирующие свойства.

Устойчивость очищенного бактериофага

Устойчивость фагового корпускула по мере очистки заметно понижается. На это было обращено внимание еще при разработке метода фракционированной элюции. Титры элюатов довольно быстро уменьша-

[2] Taches vièrges.

Таблица 3

Специфичность литического действия очищенного бактериофага

Объект / Очищенный фаг	Кишечная палочка	Дизентерийная палочка	Тифозная палочка	Стафилококк	Стрептококк	Протей	Синегнойная палочка	Палочка крысиного тифа
Бактериофаг кишечной палочки	10^{-8} стерильные пятна ∞	—	—	—	—	—	—	—
Дизентерийный бактериофаг	—	10^{-8} ++++	—	—	—	—	—	—
Бактериофаг палочки крысиного тифа	—	—	—	—	—	—	—	10^{-6} стерильные пятна
Тифозный бактериофаг	—	—	10^{-8} ++	—	—	—	—	—

лись, если они хранились какой-то срок даже в условиях ледника. Вначале казалось, что повышенное содержание солей в асканитном и норитном элюатах обусловливает инактивацию бактериофага, но последующие наблюдения как в опытах с диализом, так и при изучении свойств мелового элюата убедили в том, что возникающая лабильность фаговых частиц связана с удалением ряда веществ в процессе очистки.

Коллодийные и целлофановые мешочки, укрепленные в сосудах с дестиллированной водой, заполнялись на $^2/_3$ объема фаголизатом дизентерийной палочки, асканитным и норитным элюатами дизентерийного бактериофага. Диализ проводился в рефрижераторе при +3°, +5° в течение нескольких дней — наружная вода сменялась ежедневно. Одновременно в леднике находились фаголизат и элюаты, включая и меловой элюат, не подвергавшиеся диализу. В продолжение двух недель каждый день проводилось титрование литической силы всех опытных фракций. Титры определялись методом Аппельмана с регистрацией результатов опытов через 6 часов.

Наиболее устойчивым из всех объектов исследования (табл. 4) оказался фаголизат дизентерийной палочки. 14-дневное хранение при низкой температуре не привело к каким-либо изменениям в его титре, однако диализ несколько уменьшил количество корпускул. Судя по тому, что в наружной жидкости бактериофаг не был обнаружен, надо полагать, что в результате диализа наступила деструкция известного числа фаговых частиц. Иное наблюдалось в опытах с элюатами фага. Начиная со 2-го дня, титр асканитного элюата стал падать, и к 11-му дню бактериофаг в этом элюате мог быть определен только в разведении 1 : 100. Еще более резкое снижение титра было вызвано диализом; к 7-му дню наблюдений бактериофаг в целлофановых и коллодийных мешочках с асканитным элюатом полностью инактивировался. Те же явления, но в более быстром темпе имели место при хранении норитного элюата. На 8-й день без диализа и на 4—5-й день после диализа норитный элюат уже не содержал активного вещества. Наименее стабильным был меловой элюат. Как показали почасовые определения, инактивация его происходит спустя короткое время после получения.

Таким образом, последовательное освобождение бактериофага от компонентов бульона, продуктов обмена и распада бактериальных клеток и других веществ, которые отделяются на разных ступенях очистки, приводит к существенным изменениям в устойчивости фагового корпускула к внешним воздействиям. Лабильность очищенного дизентерийного фага настолько велика, что она не может быть сравнена не только с бульонным фаголизатом дизентерийной палочки, который сохраняет

Таблица 4

Изменения активности очищенного бактериофага при хранении на холоду

Объект наблюдений / Дни	Титры											
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11	12	14
Асканитный элюат . . .	10^{10}	10^{8}	10^{7}	10^{3}	10^{3}	10^{3}	10^{3}	10^{3}	10^{3}	10^{2}	10^{2}	10^{2}
Асканитный элюат в коллодийном мешочке (диализ)	10^{10}	10^{6}	10^{1}	10	10^{2}	—	—	—	—	—	—	—
Асканитный элюат в целлофановом мешочке (диализ)	10^{10}	10^{7}	10^{4}	10^{2}	10^{2}	—	—	—	—	—	—	—
Норитный элюат	10^{10}	10^{5}	10^{4}	10^{4}	10^{2}	10^{1}	—	—	—	—	—	—
Норитный элюат в целлофановом мешочке (диализ)	10^{10}	10^{3}	10^{1}	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Норитный элюат в коллодийном мешочке (диализ)	10^{10}	10^{1}	10^{2}	10^{1}	—	—	—	—	—	—	—	—
Меловой элюат	10^{10}	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Неочищенный дизентерийный бактериофаг .	10^{10}	10^{10}	10^{9}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{9}	10^{9}	10^{10}	10^{10}	10^{10}
Дизентерийный бактериофаг в коллодийном мешочке (диализ) . .	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{9}	10^{9}	10^{9}	100^{9}	10^{8}	10^{8}	10^{8}	10^{8}	10^{8}
Дизентерийный бактериофаг в целлофановом мешочке (диализ)	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{10}	10^{9}	10^{9}	10^{9}	10^{8}	10^{8}	10^{9}	10^{8}	10^{8}

свой титр месяцами в условиях комнатной температуры, но и с бактериофагами кокковой группы, приготовленными на физиологическом растворе, как известно, теряющим свою активность сравнительно быстро. Большой интерес представляет тот факт, что высокое содержание солей в асканитном и норитном элюатах заметно замедляет процесс инактивации бактериофага при хранении на холоду.

Снижение активности очищенного бактериофага в первые же дни после очистки отмечается в работах Kligler и Olitzki [7], Muramatsu [9], Kalmanson и Bronfenbrenner [6] и др. Kligler и Olitzki пытались предотвратить инактивацию очищенного бактериофага прибавлением к нему сыворотки, а Kalmanson и Bronfenbrenner — бульона. Однако эффект был незначительным. Устойчивость этих фагов немного возрастала, но далеко уступала устойчивости неочищенных бактериофагов.

Собственные исследования подтвердили данные указанных авторов. Добавление бульона, лошадиной сыворотки, яичного белка, желатины, агар-агара к асканитному, норитному и меловому элюатам не дало ожидаемого эффекта. Разница по сравнению с контролем была настолько невелика, что не могла приниматься в расчет.

Это побудило пойти по несколько иному пути. Была предпринята попытка восстановить устойчивость очищенного бактериофага прибав-

лением растворов, которые заключали компоненты бульонного фаголизата, отделяющиеся на различных стадиях очистки методом фракционированной элюции.

Асканитный элюат смешивался с фильтратом фаголизата и элюатом азотистых веществ (фильтратом раствора KH_2PO_4), норитный элюат соединялся с асканитным, к меловому элюату добавлялись все фракции, полученные до адсорбции бактериофага на мелу из норитного элюата, а также фильтрат этого элюата. Нет нужды подробно описывать проведенные опыты, так как они привели к отрицательным результатам — первоначальная устойчивость фаговых частиц не восстанавливалась. Заключительным этапом явились следующие эксперименты. В отличие от предыдущих, где неуспех мог быть обусловлен влиянием посторонних веществ, например, вымывающихся из асканита, или отсутствием необходимых компонентов бульонного фаголизата, остающихся на адсорбентах в связанном состоянии,— здесь применялись фаголизаты, освобожденные от бактериофага. Фильтрами, отделяющими бактериофаг от остальных частей фаголизата, служили коллодийные мембраны с величиной пор, задерживающих фаговые частицы, и мел.

Через коллодийную мембрану, приготовленную по методу Kalmanson и Bronfenbrenner, было профильтровано 200 мл бульонного фаголизата дизентерийной палочки Шига. Такое же количество пропускалось через колонку мела весом 10 г. Каждый из фильтратов смешивался в равных объемах с асканитным, норитным и меловым элюатами. Эти смеси были разделены на 2 части. Одни части выдерживались в леднике при +3°, +5° 7 дней и затем титровались по методу Аппельмана. Другие высушивались в аппарате Флорсдорфа при —5° и 120 μ остаточного давления. Сухие остатки растворялись в бульоне и испытывались на лизис капельным методом на плотной среде. Регистрация результатов опытов производилась: по капельному методу через 20 часов, а по методу Аппельмана через 6 часов.

Как видно из табл. 5, прибавление фильтратов фаголизата из-под коллодийной мембраны и меловой колонки не способствовало в какой-то мере повышению устойчивости очищенных фагов к высушиванию и хранению на холоду. Неочищенный бактериофаг сохранял свой титр после высушивания, тогда как все элюаты полностью теряли свою активность в результате сушки и в смеси с фильтратами фаголизатов. При хранении смеси также быстро снижали титр, как и элюаты, к которым не добавлялись бульонные фаголизаты, свободные от бактериофага.

Несомненное значение проведенных исследований по определению устойчивости очищенных бактериофагов заключается в том, что они убеждают в зависимости степени стабильности литических свойств фага от веществ, которые удаляются очисткой. Характерным является неодинаковая лабильность фаговых частиц в асканитном, норитном и меловом элюатах. Сравнительно более устойчивы они в первом, наименее — в меловом элюате, иными словами, в процессе очистки методом фракционированной элюции устраняются компоненты, в различной мере функционально важные для сохранения основных свойств бактериофага. Соединить чисто механическими приемами эти компоненты вновь с литическим началом не удается, что указывает на достаточно тесную связь отделяющихся элементов с небелковой субстанцией, определяющей типичные особенности фагового корпускула.

Выводы

Анализ экспериментального материала о свойствах очищенного бактериофага приводит к выводу, что корпускул фага представляет собой двухкомпонентную систему; в ней оба компонента находятся в сравнительно прочной связи. Трудно пока судить о характере этой связи, но

Таблица 5

Устойчивость очищенного бактериофага к высушиванию в смеси с отделенной фракцией фаголизата

Литическая активность	Разведения: б/р, 10^{-1} 10^{-2}, 10^{-3} 10^{-4}, 10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	Титр по Аппельману через 7 дней
Бульонный фаголизат	++++	+++	++	+	10^{10}
Фильтрат из-под колонки	—	—	—	—	
Фильтрат из-под мембраны	—	—	—	—	
Высушенный бульонный фаголизат	++++	+++	++	стерильные пятна ∞	
Асканитный элюат	++++	+++	++	стерильные пятна ∞	10^{6}
Асканитный элюат после высушивания	—	—	—	—	
Асканитный элюат + фильтрат из-под колонки	++++	+++	++	стерильные пятна ∞	10^{10}
Асканитный элюат + фильтрат из-под колонки после высушивания	—	—	—	—	
Асканитный элюат + фильтрат из-под мембраны	++++	++	++	+	10^{5}
Асканитный элюат + фильтрат из-под мембраны после высушивания	—	—	—	—	
Норитный элюат	++++	+++	+++	++	10^{11}
Норитный элюат после высушивания	—	—	—	—	
Норитный элюат + фильтрат из-под колонки	++++	+++	++	+	10^{1}
Норитный элюат + фильтрат из-под колонки после высушивания	—	—	—	—	
Норитный элюат + фильтрат из-под мембраны	++++	+++	++	стерильные пятна 23	—
Норитный элюат + фильтрат из-под мембраны после высушивания	—	—	—	—	
Меловой элюат	++++	+++	++	+	—
Меловой элюат после высушивания	—	—	—	—	
Меловой элюат + фильтрат из-под колонки	++++	++	++	+	—
Меловой элюат + фильтрат из под колонки после высушивания	—	—	—	—	
Меловой элюат + фильтрат из-под мембраны	++++	+++	++	стерильные пятна 7	—
Меловой элюат + фильтрат из-под мембраны после высушивания	—	—	—	—	

Примечание. ++++ полный лизис; +++, ++ промежуточные степени лизиса; + островки лизиса; — отсутствие лизиса; показатель степени — разведения, в которых наблюдался еще полный лизис.

не исключается здесь возможность явлений адсорбционного порядка. В пользу такого предположения говорят следующие наблюдения. Бактериофаг, адсорбированный мелом из норитного элюата, в течение нескольких дней сохраняет свою активность, если предохранить адсорбционный комплекс от высушивания, тогда как в норитном элюате титр фага резко снижается. Несравненно выше также устойчивость фага в асканитном адсорбционном комплексе после промывки раствором KH_2PO_4, чем в асканитном элюате. Поглощение бактериофага адсорбентом в какой-то мере защищает его от инактивации — вполне вероятна аналогичная взаимозависимость компонентов корпускула фага.

Можно сказать, не опасаясь переоценки метода фракционированной элюции, что он, основанный на принципах, изложенных еще Цветом [4], превосходит другие методы именно возможностью для исследователя тонкой препарировки комплексов, в которых вещества находятся в адсорбционно-связанном состоянии, благодаря включению более мощных адсорбционных сил.

Последовательное применение ряда адсорбентов позволило «обнажить» литическую группу бактериофага путем разрыва связей ее с веществами, составляющими второй компонент фагового корпускула. Эта группа, проявляющая основные черты бактериофага, вызывает лизис, специфична в своем действии, приводит к воспроизведению фага в соответствующем бактериальном субстрате, не является белком. Она не устойчива вне адсорбента и быстро теряет свойства, которые определяют функциональное значение данного компонента бактериофага. Что касается другого компонента, являющегося, несомненно, белковым комплексом (об этом позволяют судить данные серологического и химического анализов), то выяснению его роли в фаговой частице и были посвящены дальнейшие исследования.

Институт микробиологии
Академии Наук СССР
Москва

Получено 30.X.1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Иоффе В. Об одной очередной задаче в изучении проблемы инфекции и иммунитета. Журн. микроб., эпидем. и иммуноб., № 4, стр. 3, 1940.
2. Крисс А. К вопросу о природе бактериофага. Микробиология, т. X, стр. 430, 1941.
3. Крисс А. Энзимная природа бактериофага. Успехи совр. биологии, № 3, стр. 273, 1944.
4. Цвет М. Хроматографический адсорбционный анализ. Избранные работы под ред. А. А. Рихтера и Т. А. Красносельской. Изд. АН СССР, 1946.
5. Hook A., Beard D., Taylor A., Sharp D. a. Beard J. Isolation and characterization of the T_2 bacteriophage of E. coli. J. biol. Chem., v. 165, p. 241, 1946.
6. Kalmanson G. a. Bronfenbrenner J. Studies on the purification of bacteriophage. J. gen. Physiol., v. 23, p. 203, 1939.
7. Kligler J. and Olitzki L. The resistance to heat and disinfectants of protein-free eluates of a bacteriophage and Fowl-pox virus. Brit. J. Exper. Pathology, v. 12, p. 393, 1931.
8. Klieneberger E. Der Einfluss verschiedener Salze auf die Wirksamkeit von Bakteriophagensuspensionen auf ihre Filtrabilität und Adsorbierbarkeit. Ctbl. Bakt., I Abt., Bd. 118, S. 411, 1930.
9. Muramatsu K. Ueber die physikalische und chemische Beschaffenheit der Bakteriophagen. Japan. J. Exp. Med., v. 10, p. 257, 1932.
10. Northrop J. Concentration and purification of Bakteriophage. J. Gen. Physiol., v. 21, p. 335, 1938.
11. Poorter P. et Maisin J. Contribution à l'étude de la nature du principe bacteriophage. Arch. internal. pharm. dyn., T. 25, p. 473, 1921.
12. Schlesinger M. Reindarstellung eines Bakteriophagen in mit freiem Auge sichtbaren Mengen. Biochem. Z., Bd. 264, S. 6, 1933.
13. Seiffert W. Der Charakter des d'Hérelleschen Phänomens. Z. Immunitätsforsch., Bd., 38, S. 293, 1923/1924.
14. Taylor A. Chemical analysis of the T_2 bacteriophage and its host, E. coli (strain B), J. Biol. chem., v. 165, p. 271, 1946.

СЕРОДИАГНОСТИКА ВИРУСА ЖЕЛТУХИ ТУТОВОГО ШЕЛКОПРЯДА

Е. Т. Дикасова

В литературе имеются отдельные работы, в которых говорится об использовании противожелтушной сыворотки при решении теоретических вопросов, связанных с изучением природы желтушных полиэдров. Однако пока еще отсутствуют какие-либо указания о применении противожелтушной сыворотки при решении вопросов, могущих иметь и практическое значение. Так, не лишен интереса вопрос о возможности использования активной специфичной противожелтушной сыворотки для диагностических целей.

Первые, полученные нами, испытания противожелтушной сыворотки производились на гусеницах с целью выяснения возможности определения ранних стадий заболевания их желтухой.

Для диагностических целей нами была использована сыворотка, полученная в результате иммунизации кроликов очищенным препаратом свободных полиэдров (титр = 1/10 000) и сыворотка кроликов, двухкратно иммунизированных суперпреципитатом желтушных полиэдров (титр = 1/25000) [1].

При определении ранних стадий заболевания гусениц желтухой нами производилось заражение гусениц Багдадской породы на второй день V возраста инъекциями гемолимфы желтушных гусениц. Для заражения каждой гусеницы применялась доза 1/1 000 $см^3$. Через 12, 24, 36, 48, 72, 96 часов после заражения из средних 10 гусениц брали гемолимфу, смешивали с сывороткой и наблюдали за появлением реакции. Исследование производилось капельным методом на предметных стеклах.

В результате этого установлено, что гемолимфа гусениц, зараженных желтухой, через 48 часов с момента внесения инфекции дает хорошо заметную невооруженным глазом реакцию агглютинации с сывороткой, полученной от кроликов, иммунизированных препаратом свободных полиэдров, и через 24 часа с сывороткой, полученной от кроликов, иммунизированных суперпреципитат-антигеном желтушных полиэдров. Известно, что в среднем инкубационный период для желтухи длится 7—8 дней, а некоторые внешние признаки болезни проявляются только за 1—2 дня до гибели гусениц.

Несмотря на высокую чувствительность сыворотки, полученной в результате иммунизации кроликов суперпреципитатом желтушных полиэдров, в настоящее время она еще не применяется в промышленности с целью диагностики желтухи. Это объясняется тем, что заболевание гусениц желтухой носит почти повсеместный характер, вследствие чего зачастую отпадает смысл установления карантина, главным образом вследствие того, что даже при самом раннем распознавании наличия этой инфекции мы еще не владеем радикальными средствами борьбы с этим заболеванием. Значительно больший интерес представляет решение вопроса о возможности инфицирования грены.

Вопрос о путях заражения желтухой давно является спорным: происходит ли заражение каждого поколения вновь в личиночной ста-

[1] О получении сывороток подробно говорится в статье, опубликованной в журн. «Микробиология», т. XVI, стр. 329, 1947.

дии, или возбудитель болезни может передаваться от одной генерации к другой через яйцо? Решение же этого вопроса представляет наряду с теоретическим интересом и огромное практическое значение.

Komarek и Breindl [3] при исследовании гусениц монашенки пришли к выводу, что половые железы поражаются только лишь тогда, когда гусеницы уже не могут выжить.

Acqua [1] отрицает возможность передачи инфекции с яйцом бабочки.

Teodoro [6] считает, что яйца самок, содержащих полиэдры, заражены и дают всегда при смешивании со здоровыми кладками незначительный процент заболеваний, которые наблюдаются в каждой выкормке даже при наилучших условиях.

Paillot [5] допускает возможность переноса болезни через яйца, а поэтому считает необходимым вести борьбу с желтухой уже при получении яиц, рекомендуя производить быстрый и строгий отбор коконов.

Автор основывает свою теорию трансовариальной передачи желтухи через зародыш яйца. Им наблюдались мельчайшие, слабо светящиеся в затемненных полях зрения, весьма подвижные образования в содержимом яиц, полученных от бабочек, содержащих полиэдры которые он считает возбудителями желтухи и называет их Borrellina bombycis.

Однако позже были установлены такие образования не только в содержимом яиц, полученных от бабочек, зараженных желтухой, но и в яйцах здоровых бабочек.

Letje [4] отрицает возможность переноса инфекции через внутреннее содержимое яйца и утверждает об инфицировании грены вирусом желтухи с поверхности. Возможность поверхностного заражения грены, по его мнению, происходит при соприкосновении выходящих из коконов бабочек с желтушными пятнами на коконах, ошибочно оставленных при отборе.

Bergold и Schramm [2] также считают, что грена шелковичных гусениц внутри является стерильной, а молодые вылупляющиеся личинки заражаются желтухой при прогрызании яичной оболочки, которая только на поверхности содержит инфицирующие вещества — полиэдры родителей.

Таким образом, вопрос передачи полиэдерной болезни от одного поколения к другому, путем заражения яиц, является в настоящее время весьма спорным, как это видно из противоречивых высказываний вышеуказанных исследователей.

Между тем, в шелководческой литературе зафиксировано немало признанных данных, косвенно указывающих на возможность эндогенного инфицирования шелковичной грены. Так, например, установлено заболевание желтухой личинок в день выхода их из яиц. Не подлежит сомнению, что в данном случае заражение личинок вирусом желтухи происходит далеко до их выхода из яиц, так как инкубационный период для желтухи по меньшей мере может длиться 5—6 дней. Нахождение полиэдров в телах бабочек указывает на возможность инфицирования грены вирусом желтухи. Внезапные появления заболевания гусениц желтухой, когда проникновение инфекции извне кажется исключенным, давно наводило на мысль о зараженности грены.

Имея в своем распоряжении достаточно активную противовирусную сыворотку, мы исследовали грену с целью серодиагностики в ней вируса желтухи.

Для этих исследований нами была заготовлена грена, полученная от бабочек, содержащих полиэдры, грена от выкормки гусениц, сильно пострадавших от желтухи, а также грена от нормальной выкормки.

Для получения грены от бабочек, содержащих полиэдры, гусеницы выкармливались до завивки коконов. На пятый день после завивки каждый кокон надрезался, причем на нем отмечался день нимфальной линьки. На 7-й день после нимфальной линьки производилось заражение куколок гемолимфой желтушных гусениц.

Для заражения каждой куколки применялась доза желтушной гемолимфы 1/100 $см^3$. После заражения большая часть куколок погибала на 6—7-й день от желтухи, а из уцелевших выходили бабочки и откладывали грену. Среди вышедших бабочек встречались особи, не содержащие полиэдров. Поэтому бабочки от каждой кладки грены микроскопировались и из них отбирались лишь те, которые в большом количестве содержали полиэдры.

Опыты по серодиагностике желтухи в грене производились капельным методом путем смешивания отдельных капель сыворотки с белком грены, который был получен путем раздавливания яиц между двумя предметными стеклами. В результате наших исследований установлено, что сыворотка, полученная от кроликов, иммунизированных свободными полиэдрами, не дает видимой реакции с белком грены, полученной от бабочек, содержащих полиэдры. При смешивании же сыворотки, полученной в результате повторной иммунизации кроликов суперпреципитатом желтушных полиэдров с белком этой же грены, нами наблюдалась отчетливо выраженная реакция агглютинации. При смешивании нормальной сыворотки кролика (не иммунизированного) никакой реакции не наблюдалось. Когда же мы смешивали белок грены, полученной от бабочек, в которых не были обнаружены полиэдры, но которые были взяты из желтушной выкормки, нами также наблюдалась положительная реакция, но несколько слабее выраженная. Затем эта же сыворотка смешивалась с белком грены, полученной от нормальной выкормки, причем мы также наблюдали слабую, но достаточно отчетливо выраженную реакцию.

Проявление такой слабо выраженной реакции при смешивании сыворотки с белком нормальной грены нами наблюдалось постоянно при испытании грены из различных партий и пород.

Естественно возникает вопрос: не происходит ли эта реакция за счет поверхностного инфицирования грены вирусом желтухи?

Для выяснения этого предположения нами производились подобные реакции с греной, обработанной с поверхности раствором 1% NaOH в течение 3 минут с последующим 30-минутным промыванием под струей водопроводной воды. Здесь следует заметить, что 1% раствор NaOH растворяет полиэдры мгновенно. Однако эта обработка грены не оказала заметного для глаза влияния на интенсивность реакции.

Выводы

Таким образом, попытка использования противожелтушной сыворотки, полученной в результате иммунизации кроликов суперпреципитат-антигеном желтушных полиэдров, с целью серодиагностики желтухи у гусениц показала, что с помощью сыворотки имеется возможность устанавливать самые начальные стадии болезни.

Получение положительных реакций при смешивании этой сыворотки с белком грены и совпадения интенсивности их со степенью зараженности отложивших ее бабочек приводят к убеждению об эндогенном инфицировании грены.

Вопрос о возможности эндогенного инфицирования грены заслуживает специального рассмотрения, о чем будет итти речь в следующей статье.

Среднеазиатский научно-исследовательский институт шелководства (САНИИШ)
Ташкент

Получено 4. I. 1947

ЛИТЕРАТУРА

1. Acqua C. Les maladies du ver à soie (grasserie et dysenteries) par A. Paillot e i nostri studi sullo stresso argomento. Boll. Ascoli Piceno, v. VIII, No. 1, 1929.
2. Bergold G. und Schramm G. Biochemische Charakterisierung von Insektenviren. Biol. Ctbl., Bd. 62, H. 3/4, 1942.
3. Komarek I. und Breindl V. Die Wipfelkrankheit der Nonne und der Erreger derselben. Z. angew. Entom., Bd. 10, H. 1, 1924.
4. Letje N. Das Gelbsuchtsproblem bei den Seidenraupen. Seidenbauforschung, Bd. I S. 1, 1939.
5. Paillot A. Les maladies du ver à soie, grasserie et dysenteries. Lyon, 1928.
6. Teodoro G. Eil giallums una malattia ereditaria? R. Staz. Bac. Sper. di Padova, v. XLV, 1927.

РЕФЕРАТЫ

ОБЩАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ: МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

Pijper A. **Methylcellulose and bacterial mobility.** (Метилцеллюлоза и подвижность бактерий). J. of Bact., v. 53, No. 3, pp. 257—270, 1947.

Автор изучал подвижность бактерий, помещенных в коллоидный раствор метилцеллюлозы. Метилцеллюлоза делает среду вязкой, что замедляет движение бактерий и делает их более доступными наблюдению. Кроме того, оседая на поверхности бактерий, метилцеллюлоза делает их видимыми более отчетливо. Все наблюдения велись в темном поле. Объектом наблюдения в основном была E. thyphosa, а также Proteus vulgaris, B. megatherium, B. cereus, B. subtilis, Ps. fluorescens. В этой работе и в ряде ранее опубликованных работ автор доказывает, что жгутики бактерий не являются органами движения. По мнению автора, движение осуществляет протоплазма, вызывая волнообразное и вращательное движение тела. Палочковидные бактерии при движении принимают форму спирилл и вибрионов. Автор считает, что наружная оболочка бактерий состоит из полисахаридов, имеющих тенденцию образовывать нити. При движении бактерий эти нити сплетаются в волнистую «косу», которая может иногда расплетаться на отдельные нити. Автор наблюдал, что при перемене направления движения вперед и назад не «коса» ведет тело бактерии, а тело тащит за собой «косу».

И. Работнова

Kelner A. and Morton H. E. **Two antibiotics (lavendulin and actinorubin) produced by actinomyces.** [Два антибиотика (лавендулин и актинорубин), образуемые актиномицетами]. J. of Bact., v. 53, No. 6, pp. 695—704, 1947.

Из оранжерейной почвы выделены две расы Actinomyces, образующие новые антибиотики, названные авторами — лавендулин и актинорубин.

В статье дается подробное описание методов выделения культур, их культуральная характеристика, условия для максимального образования этих антибиотиков и их антибактериальные свойства in vitro.

Для образования актинорубина рекомендуется среда следующего состава: Difco-триптона — 5 г. Na_2HPO_4—1,2 г, KH_2PO_4—0,8 г, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$—0,5 г, KCl—0,5 г, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01 г, белого сахара (сахарозы) — 10 г, агара — 2,5 г, воды — 1 л, pH = 6,8—7,2. Агар прибавляется для повышения вязкости среды. При поверхностном культивировании на этой среде было получено 200—400 единиц разведения в 1 мл (dilution units) против E. coli за 8—10 дней.

Отсутствие железа в среде приводило к очень малому образованию антибиотика. Незначительное изменение концентрации $MgSO_4$ и KCl имело малое значение.

Лучшей средой для образования лавендулина авторы считают следующую: Difco-пептона — 5 г, глюкозы — 10 г, мелассы — 20 мл, дестилированной воды — 1 л.

На этой среде 1 000 единиц разведения против E. coli получалось постоянно.

В статье дается бактериальный спектр актинорубина и лавендулина, из которого следует, что последние отличаются от стрептомицина и стрептотрицина, а также друг от друга.

При постепенном приучении E. coli к повышающимся концентрациям антибиотика оказалось, что можно получить гораздо бо́льшую устойчивость к стрептомицину, чем к актинорубину или лавендулину.

Н. Авдиевич

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
Н. А. Красильников. О классификации бактерий	105
Б. Л. Исаченко. О биогенном образовании карбоната кальция	118
Т. А. Таусон. О влиянии стеринов на жизнедеятельность микроорганизмов. I. О физиологическом значении эргостерина для дрожжей и эндомицетов	126
А. Г. Романкова. Антагонизм между плесневыми грибами	132
В. И. Билай. Действие экстрактов токсических грибов на животные и растительные ткани	142
Л. Ю. Медвинская и В. С. Рождественский. Споровая эпифитная микрофлора зерна пшеницы	148
М. А. Мессинева. Характеристика микрофлоры соленоводных водоемов Таманского полуострова	153
Л. П. Старыгина и Н. А. Шишелова. Возбудители мягкой гнили семенников капусты	160
А. Э. Смирнова. Быстрый метод контроля над нарастанием дрожжевой массы в процессе брожения	171
А. Е. Крисс и Е. А. Рукина. О природе бактериофага. II. Очищенный бактериофаг и его свойства	176
Е. Т. Дикасова. Серодиагностика вируса желтухи тутового шелкопряда	189
Рефераты	192

Подписано к печати 19.III.1948 г. Тираж 3300 экз. А02698 Заказ 214 Уч.-изд. л. 9,2 5¼ печ. л. +2 вклейки

2-я типография Изд-ва Академии Наук СССР Москва, Шубинский пер., д. 10

Цена 9 руб.